UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS COM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA E BIOESTIMULANTES PARA O CULTIVO *IN VITRO* DE *Cattleya nobilior* Rchb.f.

RAYNER BUENO PEINADO

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2026

ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS COM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA E BIOESTIMULANTES PARA O CULTIVO *IN VITRO* DE *Cattleya nobilior* Rchb.f.

RAYNER BUENO PEINADO
Engenheiro Agrônomo

Orientador: PROF. DR. JOSÉ CARLOS SORGATO

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Dourados
Mato Grosso do Sul
2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P378e Peinado, Rayner Bueno

ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS COM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA E BIOESTIMULANTES PARA O CULTIVO IN VITRO DE Cattleya nobilior Rchb.f. [recurso eletrônico] / Rayner Bueno Peinado. -- 2026.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: José Carlos Sorgato .

Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2026.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em: https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio

1. Orchidaceae. 2. Horticultura ornamental. 3. Orquídeas nativas. I. Sorgato, José Carlos. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS COM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA E BIOESTIMULANTES PARA O CULTIVO IN VITRO DE *Cattleya nobilior* Rchb.f.

por

RAYNER BUENO PEINADO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA

Aprovada em: 26/02/2026.

gov.br Documento assinado digitalmente
JOSE CARLOS SORGATO
Data: 29/10/2026 16:33:51-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. José Carlos Sorgato

Orientador - UFGD

gov.br Documento assinado digitalmente
LUAN MARLON RIBEIRO
Data: 29/10/2026 17:24:13-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Luan Marlon Ribeiro

UFGD

W. Vendrame

Prof. Dr. Wagner Aparecido Vendrame

University of Florida

GOV.BR Documento assinado digitalmente
ROSETE PESCADOR
Data: 30/10/2026 07:56:05-0300
CPF: ***.337.599-**
Verifique as assinaturas em https://v.ufsc.br

Prof. Dra. Rosete Pescador

UFSC

gov.br Documento assinado digitalmente
LUCAS LORAM LOURENCO
Data: 29/10/2026 17:38:31-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Lucas Loram Lourenço

IFTO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido a realização deste sonho e por me conceder forças para chegar ao final desta etapa.

Ao meu orientador, Professor Doutor José Carlos Sorgato, pela paciência, pela dedicação e comprometimento, sempre com seu profissionalismo repassando seu conhecimento e auxiliando em todas as etapas para a realização deste trabalho.

À minha família, Ilda Mataruco Bueno, Paulo Cesar Peinado, Simone Menezes Bueno, Redelen Bueno Peinado e Riley Bueno Peinado, que acima de tudo me ajudaram a chegar onde estou. Obrigado pelo apoio incondicional, compreensão e incentivo constantes; vocês são meu porto seguro na realização dos meus sonhos.

Ao meu avô (*in memoriam*), que, apesar de não estar presente, estaria orgulhoso da pessoa e o profissional que me tornei.

Em especial, minha mãe Simone Menezes Bueno, que abraçou a causa e este sonho, tornando possível a realização desta etapa tão importante da minha vida. Sou imensamente grato por ter você ao meu lado.

Ao Grupo de Ensino e Pesquisa em Horticultura Ornamental – GEHORTI, por terem me acolhido, ensinado e me moldado, aprimorando meus conhecimentos e me transformando em um profissional qualificado, em especial a doutora Jackeline Schultz Soares, doutor Luan Marlon Ribeiro e ao Marcos Vinnicius Braga Machado de Queiroz que sempre me auxiliaram e ofereceram apoio em todas as etapas deste processo; minha sincera gratidão.

Ao Jean André Sausen, por estar presente nesta etapa da minha vida, incentivando e oferecendo apoio essencial para a realização deste sonho.

A Capes, Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e ao seu corpo docente, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos, sempre com profissionalismo e dedicação.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL vii
ABSTRACT viii
INTRODUÇÃO GERAL 1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 5
CAPÍTULO I - *Moringa oleifera* Lam. NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Cattleya nobilior* Rchb.f. 8
RESUMO 8
ABSTRACT 9
INTRODUÇÃO 10
MATERIAL E MÉTODOS 13
RESULTADOS E DISCUSSÃO 16
CONCLUSÃO 26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 27
CAPÍTULO ll - *Chlorella* sp. NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Cattleya nobilior* Rchb.f. 32
RESUMO 32
ABSTRACT 33
INTRODUÇÃO 34
MATERIAL E MÉTODOS 37
RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
CONCLUSÃO 50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51
CONSIDERAÇÕES FINAIS 55

BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA E BIOESTIMULANTES NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Cattleya nobilior* Rchb.f.

RESUMO GERAL

A família Orchidaceae possui representatividade no Cerrado brasileiro; contudo, a beleza e diversidade de suas flores tornam várias espécies vulneráveis à coleta predatória. Entre elas, *Cattleya nobilior* destaca-se pelo elevado valor ornamental e pelo risco de redução populacional devido ao extrativismo. Uma estratégia eficiente para diminuir essa vulnerabilidade é o desenvolvimento de protocolos de produção comercial associados à conservação *ex situ* por meio do cultivo *in vitro*. Assim, objetivou-se avaliar técnicas de micropropagação utilizando bioestimulantes e diferentes sistemas de cultivo para otimizar o crescimento de *C. nobilior*. Para atingir os objetivos, foram conduzidos dois experimentos independentes. Em ambos, foram avaliados o crescimento *in vitro* da espécie, sendo cultivadas em dois sistemas: sistema convencional (SCC) e biorreator de imersão temporária (BIT), submetidas a diferentes concentrações de bioestimulantes: 1) *Moringa oleifera* (0; 12,5; 25,0; 37,5 e 50 g L^{-1}) e 2) *Chlorella* sp. (0,0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 g L^{-1}). Após 90 dias, as plantas foram avaliadas quanto ao crescimento vegetativo *in vitro*. Os experimentos tiveram o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5 (dois sistemas de micropropagação e 5 concentrações do bioestimulante) com quatro repetições. Para o experimento 1, o BIT apresentou desempenho superior ao sistema de cultivo convencional na maioria das características de crescimento, destacando as concentrações de 37,5 e 50 g L^{-1} de *M. oleifera*, que promoveram o aumento no número de folhas, comprimento total e no comprimento da raiz. No experimento 2, as concentrações de *Chlorella* sp. não favoreceram o crescimento da planta, porém aumentaram o número de brotações e número de folhas, indicando respostas diferenciadas entre os órgãos vegetativos e evidenciando seu uso para a conservação e multiplicação da espécie. De modo geral, os experimentos evidenciam que o biorreator de imersão temporária é uma tecnologia eficiente para o cultivo *in vitro* de *C. nobilior*, proporcionando maior crescimento e vigor das plantas. Além disso, tanto *Moringa oleifera* quanto *Chlorella* sp. apresentam potencial como bioinsumos, desde que aplicados em concentrações adequadas às necessidades fisiológicas para cada espécie. Assim, seus usos associados ao BIT constituem estratégias promissoras para a produção comercial e conservação *ex situ* de *C. nobilior*.

Palavras-chave: Orchidaceae; Horticultura ornamental; Orquídeas nativas.

TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR AND BIOSTIMULANTS ON THE *IN VITRO* CULTIVATION OF *Cattleya nobilior* Rchb.f.

ABSTRACT

The Orchidaceae family has great representativeness in the Brazilian Cerrado; however, the beauty and diversity of its flowers make several species vulnerable to predatory collection. Among them, *Cattleya nobilior* stands out due to its high ornamental value and the risk of population reduction resulting from extractivism. An efficient strategy to reduce this vulnerability is the development of commercial production protocols associated with *ex situ* conservation through *in vitro* cultivation. Thus, the objective was to evaluate micropropagation techniques using biostimulants and different cultivation systems to optimize the growth of *C. nobilior*. To achieve this objective, two independent experiments were conducted. In both experiments, *in vitro* growth of the species was evaluated, with plants cultivated in two systems: conventional system (SCC) and temporary immersion bioreactor (BIT), and subjected to different concentrations of biostimulants: 1) *Moringa oleifera* (0; 12.5; 25.0; 37.5 and 50 g L^{-1}) and 2) *Chlorella* sp. (0.0; 0.15; 0.30; 0.45; 0.60 g L^{-1}). After 90 days, the plants were evaluated for *in vitro* vegetative growth. The experiments were arranged in a completely randomized design in a 2 × 5 factorial scheme (two micropropagation systems and five biostimulant concentrations), with four replications. In experiment 1, the TIB showed superior performance compared to the conventional cultivation system for most growth characteristics, highlighting the concentrations of 37,5 and 50 g L^{-1} of *M. oleifera*, which promoted increases in the number of leaves, total length, and root length. In experiment 2, the concentrations of *Chlorella* sp. did not favor plant growth; however, they increased the number of shoots and leaves, indicating differentiated responses among vegetative organs and evidencing its use for species conservation and multiplication. Overall, the experiments demonstrate that the temporary immersion bioreactor is an efficient technology for *in vitro* cultivation of *C. nobilior*, providing greater growth and plant vigor. In addition, both *Moringa oleifera* and *Chlorella* sp. show potential as bio-inputs, provided they are applied at concentrations appropriate to the physiological needs of each species. Thus, their use associated with TIB constitutes promising strategies for commercial production and *ex situ* conservation of *C. nobilior*.

Keywords: Orchidaceae; Ornamental horticulture; Native orchids.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a produção de flores e plantas ornamentais apresenta-se como uma atividade promissora e estratégica, pois permite a exploração economicamente rentável (JUNQUEIRA & PEETZ, 2018; LI et al., 2021). Em 2024, o setor de floricultura brasileiro movimentou cerca de 21 bilhões de reais, registrando crescimento de 9,95% em relação ao ano anterior. Dentre os setores de produção, destacam-se as flores de vaso (58%), plantas ornamentais (24%), flores de corte (15%), e outros (3%), segundo os dados do IBRAFLOR (2025). Representando grande parte do comércio de floricultura, as orquídeas são amplamente valorizadas por suas flores de corte e plantas ornamentais em vaso, sendo apreciadas por sua diversidade morfológica, coloração exuberante e elevada longevidade pós-colheita (YUAN et al., 2021; TIRUWA et al., 2024).

A família Orchidaceae destaca-se como uma das maiores entre as angiospermas em termos de riqueza de espécies (ZHANG et al., 2022). O Brasil possui aproximadamente 2.666 espécies distribuídas em 247 gêneros, dos quais 23 gêneros e 1.534 espécies endêmicas do país. Entre os biomas brasileiros, o Cerrado destaca-se como um dos domínios fitogeográficos mais ricos em espécies da família Orchidaceae, apresentando 652 espécies registradas (FLORA E FUNGA, 2026).

Dentre essas espécies, a *Cattleya nobilior* Rchb.f. conhecida como a "Rainha do Cerrado", uma orquídea nativa do Brasil com ampla distribuição geográfica, ocorrendo nos estados de Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia e Tocantins, podendo ser encontrada nos biomas de Cerrado e Floresta amazônica (FLORA E FUNGA, 2026). É uma planta de hábito epífito ou rupícola, com caule rizomatoso, apresentando uma ou duas folhas, cujas as flores são altamente apreciadas em razão de suas colorações variadas, que incluem tons de rosa escuro, rosa claro ou lilás, com emissão de uma a três flores por planta (BFG, 2018). A exuberância das espécies de orquídeas nativas e endêmicas do Brasil contribui para o seu elevado potencial ornamental (CASTRO et al., 2022; RIBEIRO et al., 2024).

Apesar desse potencial, as espécies nativas sofrem com a coleta predatória, além da degradação dos seus habitats naturais. Esses fatores têm acelerado o declínio populacional de diversas espécies, colocando em risco sua conservação *in situ* e evidenciando a necessidade de estratégias sustentáveis de produção e conservação. De acordo com Bullough et al. (2021), em pesquisas de caráter social, os entrevistados relataram que o comércio de plantas ornamentais é fortemente impulsionado por espécies

nativas. Diante desses cenários, as estratégias de propagação *ex situ*, sobretudo por meio do cultivo *in vitro*, apresentam-se como alternativas viáveis e sustentáveis para a conservação dessas espécies (SANTOS et al., 2021; FERREIRA, 2022).

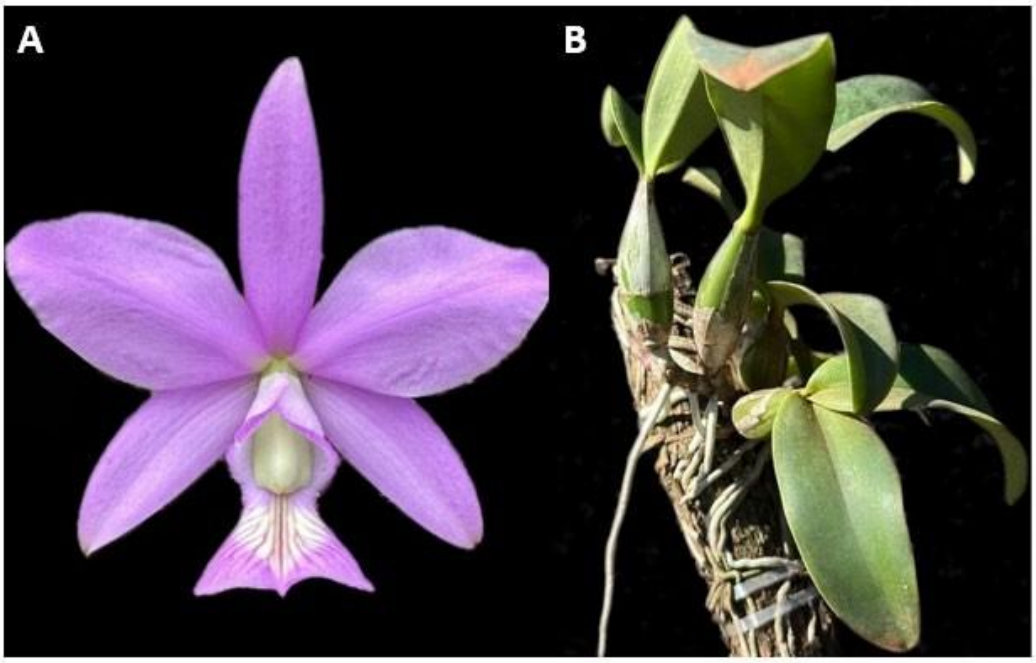


FIGURA 1. Aspectos morfológicos gerais de *Cattleya nobilior* Rchb.f. A- Flor e B- Aspectos vegetativos. Foto: Peinado, R. B., 2025.

A micropropagação *in vitro* surge como uma opção viável, assegurando a qualidade genética e fitossanitária das plantas, uma vez que o cultivo é realizado em recipientes estéreis e sob condições ambientais controladas. Essa técnica tem se consolidado como uma ferramenta estratégica, oferecendo vantagens expressivas quanto à multiplicação rápida, propagação livre de doenças, melhoramento genético e conservação de recursos genéticos vegetais (TEIXEIRA, 2023; KULUS et al., 2024). No entanto, embora sua eficiência seja amplamente reconhecida, a produção de plantas ornamentais demanda sistemas que combinem maior eficiência produtiva com a utilização mais racional dos recursos e do ambiente (SALACHNA, 2022).

Nesse contexto, a adoção de sistemas de cultivo inovadores e eficientes torna-se fundamental para superar as limitações do cultivo convencional, principalmente no que se refere à viabilidade comercial. Dentre as técnicas de cultivo, os biorreatores de imersão temporária se destacam por permitirem o controle dos parâmetros físicos essenciais ao desenvolvimento das plantas, além de promoverem o contato temporário e eficiente das

plantas com o meio nutritivo, favorecendo a absorção uniforme de nutrientes essenciais. Assim, esses sistemas vêm sendo utilizados para propagação de diferentes gêneros de orquídeas, com adaptações nos meios de culturas, reguladores de crescimento e explantes para cada espécie (VENDRAME et al., 2023; NONGDAM et al., 2023).

Associado aos sistemas de cultivo, a composição do meio nutritivo exerce influência direta sobre a eficiência dos protocolos de cultivo *in vitro* (HAMDENI et al., 2022). Nesse sentido, os meios de cultura podem ser modificados pela adição de materiais orgânicos de baixo custo, como alternativa aos aditivos sintéticos dispendiosos (DE STEFANO et al., 2022). A incorporação desses aditivos pode estimular o crescimento dos tecidos, aumentar a emissão de brotos, folhas e raízes e contribuir para a propagação e conservação de orquídeas ameaçadas de extinção (MERCADO et al., 2022).

Desta forma, compostos orgânicos têm demonstrado elevado potencial na promoção da propagação *in vitro*, conforme observado em estudos com *Dendrobium moniliforme* (L.) Swartz (HWANG et al., 2024), *Cattleya warscewiczii* Rchb.f., *Cattleya gaskelliana* (N.E.Br.) B.S.Williams (MERCADO et al., 2022), *Dendrobium antennatum* (Lindl.) (GAÁL et al., 2025) e *Cattleya nobilior* Rchb.f. (NUNES et al., 2025).

Dentre esses compostos, os bioestimulantes são produtos constituídos por substâncias naturais de origens diversas, cujas categorias incluem ácidos húmicos e fúlvicos, hidrolisados proteicos e aminoácidos, extratos de algas marinhas, além de microrganismos benéficos, como fungos e bactérias, e elementos inorgânicos, tais como fosfito e silício (DU JARDIN, 2015; BOUTAHIRI et al., 2024; BRASIL, 2025). A funcionalidade desses produtos não se restringe à simples nutrição mineral, podendo atuar como sinalizadores bioativos que modulam vias metabólicas e a expressão gênica. Fisiologicamente, esses compostos interferem no equilíbrio hormonal endógeno, influenciando a síntese e a atividade de fitormônios como auxinas, citocininas e ácido salicílico, fundamentais para a regulação do desenvolvimento vegetal (NGOROYEMOTO et al., 2019; ZULFIQAR et al., 2020).

Essa regulação fisiológica pode desencadear respostas diretas, como o aumento da atividade antioxidante, a redução da peroxidação lipídica nas membranas celulares e o incremento nos teores de clorofila e na taxa fotossintética. Consequentemente, viabiliza a expressão do potencial genético da planta, favorecendo a eficiência na absorção e transporte de nutrientes e ampliando a tolerância a estresses abióticos (GODÍNEZ-MENDOZA et al., 2023; BOUTAHIRI et al., 2024; MARTÍNEZ-LORENTE et al., 2024). A utilização desses compostos amplia a eficiência do uso de

recursos e reduz a dependência de insumos sintéticos, viabilizando sistemas de cultivo de menor impacto ambiental e maior sustentabilidade ecológica (ROUPHAEL & COLLA, 2020).

Nesse contexto, a utilização de bioestimulantes na produção de mudas de espécies nativas pode impulsionar o crescimento e elevar o padrão de qualidade das plantas produzidas (COIMBRA et al., 2021), além de contribuir com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU (Agenda 2030), especialmente em relação aos ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável), 12 (Consumo e Produção Responsáveis) e 15 (Vida Terrestre) ao favorecer uma produção mais sustentável e a conservação da biodiversidade (ONU, 2015).

Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito da suplementação do meio de cultura com bioestimulantes no cultivo *in vitro* de *Cattleya nobilior* Rchb.f., visando otimizar o crescimento–das plantas, contribuindo para o aprimoramento dos protocolos de micropropagação da espécie, aliando eficiência produtiva e sustentabilidade e auxiliando estratégias de conservação *ex situ* de orquídeas nativas e de elevado valor ornamental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BFG - THE BRAZIL FLORA GROUP. Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, v. 69, p. 1513-1527, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA. Conceitos sobre bioinsumos. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/conceitos>. Acesso em: 06 dez. 2025.

BOUTAHIRI, S.; BENRKIA, R.; TEMBENI, B.; IDOWU, O. E.; OLATUNJI, O. J. Effect of biostimulants on the chemical profile of food crops under normal and abiotic stress conditions. **Current Plant Biology**, Amsterdam, v. 40, p. 100410, 2024.

BULLOUGH, L. -A.; NGUYÊN, N.; DRURY, R.; HINSLEY, A. Orchid obscurity: understanding domestic trade in wild-harvested orchids in Viet Nam. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, p. 631795, 2021.

CASTRO, A. C. R. D.; CORREIA, D.; SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H. D.; FRANCO, J.; CAVALCANTI, T. B.; SILVA, D. A. D. Brazilian ornamental phytogenetic resources in Embrapa germplasm banks: obstacles and opportunities. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 396- 406, 2022.

COIMBRA, J. V. M.; LIMA, A. P. L.; LIMA, S. F.; SILVA, L. D. D. Moinha de carvão e bioestimulante vegetal na formação de mudas de cedro Australiano. **Interação**, v. 21, n. 1, p. 298-316, 2021.

DE STEFANO, D.; COSTA, B. N. S.; DOWNING, J.; FALLAHI, E.; KHODDAMZADEH, A. *In-vitro* micropropagation and acclimatization of an endangered native orchid using organic supplements. **American Journal of Plant Sciences**, v. 13, n. 3, p. 380-393, 2022.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia horticulturae**, v. 196, p. 3-14, 2015.

FERREIRA, W. D. M.; OLIVEIRA, A. M. D.; VIANA, J. C.; SUZUKI, R. M.; OLIVEIRA, J. R. G. D. Asymbiotic germination, initial development *in vitro* and acclimatization of *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne, a Brazilian Savanna orchid species. **Rodriguésia**, v. 73, p. e01272020, 2022.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. Orchidaceae in Flora e Funga do Brasil**.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB179>. Acesso em: 10 fev. 2026.

GAÁL, B.; TILLY-MÁNDY, A.; HONFI, P.; MOSONYI, I.; MOLNÁR, S. Alternative carbohydrate supplementation with honey in the *in vitro* propagation of *Dendrobium antennatum* (Lindl.). ***In Vitro*** **Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 61, p. 1-11, 2025.

GODÍNEZ-MENDOZA, P. L.; RICO-CHÁVEZ, A. K.; FERRUSQUÍA-JIMÉNEZ, N. I.; CARBAJAL-VALENZUELA, I. A.; VILLAGÓMEZ-ARANDA, A. L.; TORRES-PACHECO, I.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G. Plant hormesis: Revising of the concepts of biostimulation, elicitation and their application in a sustainable agricultural production. **Science of The Total Environment**, v. 894, p. 164883, 2023.

HAMDENI, I.; LOUHAICHI, M.; SLIM, S.; BOULILA, A.; BETTAIEB, T. Incorporation of organic growth additives to enhance *in vitro* tissue culture for producing genetically stable plants. **Plants**, v. 11, n. 22, p. 3087, 2022.

HWANG, J. E.; PARK, H. B.; JEON, D. Y.; PARK, H. J.; KIM, S.; LEE, C. W.; YOON, Y. J. Effect of different basal media and organic supplements on *in vitro* seedling development of the endangered orchid species *Dendrobium moniliforme* (L.) Swartz. **Plants**, v. 13, n. 19, p. 2721, 2024.

IBRAFLOR. Análise do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil. 2025. Disponível em: <https://www.ibraflor.com.br/n%C3%BAmeros-do-setor-c%C3%B3pia>. Acesso em: 4 jan 2026.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Sustainability in Brazilian floriculture: introductory notes to a systemic approach. **Ornamental Horticulture**, v. 24, p. 155-162, 2018.

KULUS, D.; TYMOSZUK, A. Advancements in *in vitro* technology: A comprehensive exploration of micropropagated plants. **Horticulturae**, v. 10, n. 1, p. 88, 2024.
LI, C.; DONG, N.; ZHAO, Y.; WU, S.; LIU, Z.; ZHAI, J. A review for the breeding of orchids: Current achievements and prospects. **Horticultural Plant Journal**, v. 7, n. 5, p. 380-392, 2021.

MARTÍNEZ-LORENTE, S. E.; MARTÍ-GUILLÉN, J. M.; PEDREÑO, M. Á.; ALMAGRO, L.; SABATER-JARA, A. B. Higher plant-derived biostimulants: mechanisms of action and their role in mitigating plant abiotic stress. **Antioxidants**, Basel, v. 13, n. 3, p. 318, 2024.

MERCADO, S. A. S.; JAIMES, Y. M. O. Inclusion of organic components in culture medium to improve the *in vitro* propagation of *Cattleya warscewiczii* and *Cattleya gaskelliana*. **South African Journal of Botany**, v. 148, p. 352-359, 2022.

NGOROYEMOTO, N.; GUPTA, S.; KULKARNI, M. G.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Effect of organic biostimulants on growth and biochemical composition of *Amaranthus hybridus* L. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 87-93, 2019.

NONGDAM, P.; BELESKI, D. G.; TIKENDRA, L.; DEY, A.; VARTE, V.; EL MERZOUGUI, S.; PEREIRA, V. M.; BARROS, P.R.; VENDRAME, W. A. Orchid micropropagation using conventional semi-solid and temporary immersion systems: a review. **Plants**, v.12, n.1136, 2023.

NUNES, G. P.; SORGATO, J. C.; RAMOS, J. C. M.; SOARES, J. S.; REZENDE, R. K. S.; PEINADO, R. B. Innovations in micropropagation of the orchid *Cattleya nobilior*: the effect of bioreactor and enriched culture media. **Ciência Rural**, v. 55, n. 6, p. e20240271, 2025.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). Transformando nosso mundo: a Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável. Nova York: ONU, 2015. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs> . Acesso em: 16 jan. 2026.

RIBEIRO, I. S.; RIBEIRO, L. M.; RAMOS, J. C. M.; SOARES, J. S.; SORGATO, J. C. The Brazilian native orchid *Brassavola tuberculata* Hook.: ornamental potential and reintroduction. **Ornamental Horticulture**, v. 30, p. e242768, 2024.

ROUPHAEL, Y., COLLA, G. Biostimulants in agriculture. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 40, 2020.

SALACHNA, P. Trends in ornamental plant production. **Horticulturae**, v. 8, n. 5, p. 413, 2022.

SANTOS, G. L.; PEREIRA, M. G.; DELGADO, R. C.; MAGISTRALI, I. C.; DA SILVA, C. G.; DE OLIVEIRA, C. M. M.; DA SILVA, T. P. Degradation of the Brazilian Cerrado: Interactions with human disturbance and environmental variables. **Forest Ecology and Management**, v. 482, p. 118875, 2021.

TEIXEIRA, J. **B. Biorreatores de imersão permanente e de imersão temporária: constituição básica e funcionamento**. 21. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2023. 119 p.

TIRUWA, B. L.; NEUPANE, B. D.; KADARIYA, R.; POKHERAL, C. P.; PANT, B. Diversity of orchids in terms of their distribution, uses and conservation in Annapurna Conservation Area of Nepal. **American Journal of Plant Sciences**, v. 15, n. 6, p. 422-440, 2024.

VENDRAME, A. W.; XU, J.; BELESKI, D. G. Micropropagation of *Brassavola nodosa* (L.) Lindl. Using SETISTM bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 153, n. 1, p. 67-76, 2023.

YUAN, S. C.; LEKAWATANA, S.; AMORE, T. D.; CHEN, F. C.; CHIN, S. W.; VEGA, D. M.; WANG, Y. T. The global orchid market**.** In: CHEN, F. C.; CHIN, S. W. (Ed.). **The orchid genome**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 1-28.

ZHANG, D.; ZHAO, X. W.; LI, Y. Y.; KE, S. J.; YIN, W. L.; LAN, S.; LIU, Z. J. Advances and prospects of orchid research and industrialization. **Horticulture Research**, v. 9, p. 220, 2022.

ZULFIQAR, F.; CASADESÚS, A.; BROCKMAN, H.; MUNNÉ-BOSCH, S. An overview of plant-based natural biostimulants for sustainable horticulture with a particular focus on moringa leaf extracts. **Plant Science**, v. 295, p. 110194, 2020.

CAPÍTULO I - *Moringa oleifera* Lam. NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Cattleya nobilior* Rchb.f.

RESUMO

A família Orchidaceae apresenta elevada diversidade e importância ecológica e ornamental, destacando-se *Cattleya nobilior* Rchb.f., espécie nativa do Cerrado brasileiro. A degradação dos habitats naturais tem comprometido sua conservação, tornando necessárias estratégias eficientes de propagação ex situ. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de extrato foliar de *Moringa oleifera* Lam., em diferentes concentrações, associada a distintos sistemas de cultivo in vitro, sobre o desenvolvimento de *C. nobilior*. Plantas oriundas de germinação assimbiótica foram cultivadas em meio MS (½) suplementado com 0,0; 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0 g L^{-1} de extrato de moringa, em sistema de cultivo convencional (SCC) e em biorreator de imersão temporária (BIT). Após 90 dias de cultivo, foram avaliadas número de folhas, massa fresca, comprimento da maior folha, comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea, número de brotos, comprimento total e número de raízes. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 × 5 (dois sistemas de micropropagação e cinco concentrações de *M. oleifera*), com 4 repetições. Os resultados evidenciaram efeito significativo da interação entre sistemas de cultivo e concentrações do extrato, com desempenho superior do BIT em relação ao SCC. A concentração de 50 g L^{-1} associada ao BIT promoveu maiores incrementos em massa fresca, comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz e comprimento total das plantas. Embora o número de raízes tenha sido superior na ausência do extrato, os tratamentos com maiores concentrações de moringa favoreceram o alongamento radicular, característica fundamental para o sucesso da aclimatização das plantas micropropagadas. Conclui-se que a combinação do extrato de moringa com o sistema de imersão temporária constitui uma estratégia eficiente, para a micropropagação de *C. nobilior*, oferecendo uma alternativa sustentável para sua conservação e produção.

Palavras-chave: Bioestimulante; Orchidaceae; Espécie nativa.

Moringa oleifera Lam. IN THE *IN VITRO* CULTURE OF *Cattleya nobilior* Rchb.f.

ABSTRACT

The Orchidaceae family exhibits high diversity and ecological and ornamental importance, with *Cattleya nobilior* Rchb.f., a native species of the Brazilian Cerrado, standing out. The degradation of natural habitats has compromised its conservation, making efficient ex situ propagation strategies necessary. In this context, the present study aimed to evaluate the effect of adding *Moringa oleifera* Lam. leaf extract, at different concentrations, associated with different *in vitro* culture systems, on the development of *C. nobilior*. Plants originating from asymbiotic germination were cultivated in MS (½) medium supplemented with 0.0; 12.5; 25.0; 37.5 and 50.0 g L^{-1} of aqueous moringa extract, in a conventional culture system (SCC) and in a temporary immersion bioreactor (BIT). After 90 days of cultivation, the following parameters were evaluated: number of leaves, fresh mass, length of the longest leaf, length of the longest root, shoot length, number of shoots, total length, and number of roots. A completely randomized design in a 2 × 5 factorial scheme (two micropropagation systems and five concentrations of *M. oleifera*) was used, with 4 replications. The results showed a significant interaction effect between cultivation systems and extract concentrations, with superior performance of BIT compared to SCC. The concentration of 50 g L^{-1} associated with BIT promoted greater increases in fresh mass, shoot length, length of the longest root, and total plant length. Although the number of roots was higher in the absence of the extract, the treatments with higher concentrations of moringa favored root elongation, a fundamental characteristic for the successful acclimatization of micropropagated plants. It is concluded that the combination of moringa extract with the temporary immersion system constitutes an efficient, sustainable, and low-cost strategy for the micropropagation of *C. nobilior*, offering a sustainable alternative for its conservation and production.

Keywords: Biostimulant; Orchidaceae; Native species.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é considerada a maior entre as angiospermas, com mais de 800 gêneros e 30.000 espécies no mundo (WFO, 2026). No Brasil, são descritos 247 gêneros, destacando-se *Cattleya* spp., com 107 espécies, das quais 100 são endêmicas (FLORA E FUNGA, 2026). Dentre elas, *Cattleya nobilior* Rchb.f., conhecida como "Rainha do Cerrado", é valorizada por seu potencial ornamental, variabilidade genética e durabilidade das flores, além de sua representatividade sociocultural, sendo a flor símbolo do Estado de Mato Grosso do Sul (OSTETTO, 2015; BRASIL, 2019) (Figura 1).

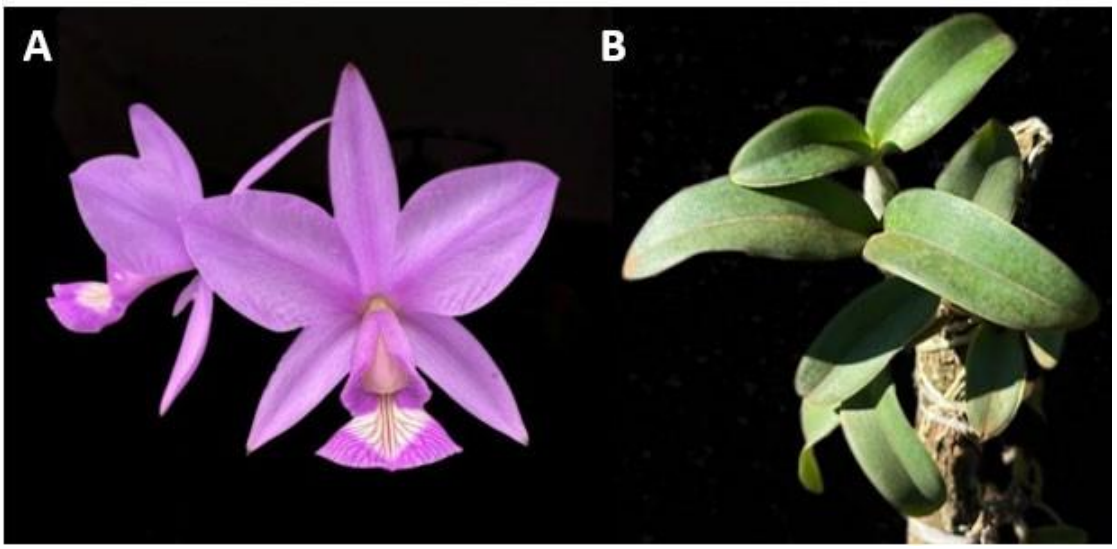


FIGURA 1. Aspectos morfológicos gerais de *Cattleya nobilior* Rchb.f. A- Flor e B- Aspectos gerais. Foto: Peinado, R. B., 2026.

Apesar de sua relevância ecológica e sociocultural, orquídeas nativas sofrem pressão antrópica associada à degradação de habitat, coleta ilegal e comércio insustentável, contribuindo para o declínio populacional de diversas espécies (TICKTIN et al., 2023; SINGER et al., 2024). A perda de biodiversidade tem levantado preocupações e impactos na estabilidade de ecossistemas, reforçando a necessidade de estratégias efetivas de conservação (PEIXOTO et al., 2022; LIU et al., 2023; KUMAR et al., 2024).

Nesse contexto, técnicas de propagação *in vitro* têm sido consideradas uma estratégia de conservação *ex situ*, constituindo método eficiente para a propagação em larga escala e para a conservação de plantas raras, ameaçadas ou em perigo de extinção (KUMAR et al., 2022). A propagação *in vitro* de orquídeas utilizando meios semissólidos

oferece excelente perspectiva de produção rápida, de qualidade e em larga escala, entretanto, esse sistema apresenta desvantagens, como baixas taxas de multiplicação e altos custos de produção (MIRZABE et al., 2022), consequentemente não suprindo a demanda de plantas para fins comerciais e de conservação.

Nesse cenário, a micropropagação em biorreatores de imersão temporária (BIT) tem sido proposta para superar limitações do sistema semissólido, reduzindo custos e possibilitando aumento de escala e automação na produção de plantas (NONGDAM et al., 2023). Além do ganho de eficiência, esses sistemas podem ser considerados uma alternativa mais sustentável no cultivo *in vitro*, por favorecerem o uso racional de insumos e maior padronização do processo, aspectos relevantes para a produção e a conservação em larga escala. Resultados positivos com BIT têm sido relatados para diferentes espécies de orquídeas, como *Mokara* leuenberger (MINH, 2022), *Cattleya tigrina* A.Rich. (FRITSCHE et al., 2022), *Brassavola nodosa* (L.) Lindl. (VENDRAME et al., 2023), *Coelogyne pandurata* Lindl., (RAHAYU et al., 2023), *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins (HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2024), *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr. (LÓPEZ-ESCAMILLA et al., 2024), Vanda *celebica* Rolfe (LAILY et al., 2024), *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume (BAROUGH et al., 2024) e *Cattleya nobilior* Rchb.f. (NUNES et al., 2025), e *Rhyncattleanthe* Queen Bee 'JLA 1' (*Rhyncholaeliocattleya Hwa Yuan Grace* × *Cattlianthe Chocolate Drop*.) (SOLANO-RODRÍGUEZ et al., 2025).

A eficiência dos protocolos de micropropagação depende de diferentes fatores, especialmente do meio de cultura (FREITAS et al., 2021). Assim, a busca por alternativas de baixo custo e elevada eficiência tem motivado o uso de materiais orgânicos como substitutos ou complementos a aditivos sintéticos mais onerosos, uma vez que podem fornecer vitaminas, aminoácidos e compostos orgânicos com efeito fisiológico relevante ao cultivo *in vitro* (HAMDENI et al., 2022; DE STEFANO et al., 2022). Entre essas alternativas, bioestimulantes têm sido descritos como substâncias ou microrganismos capazes de estimular processos fisiológicos e melhorar o desempenho das plantas, sendo utilizados também em horticultura ornamental (PADMAJA et al., 2023; KUMARI et al., 2022; KISVARGA et al., 2022; RATHNAYAKA et al., 2023).

Assim, o uso de extratos foliares de *Moringa oleifera* Lam. tem sido apontado como uma alternativa eficaz para simplificar a composição e reduzir custos de meios de cultura, promovendo o crescimento *in vitro* de diversas espécies botânicas (MARDIANA & SUMARJI, 2021; NIHAYATI et al., 2021). Originária da Índia e amplamente

difundida no Brasil, *M. oleifera* apresenta um perfil fitoquímico complexo, rico em fitormônios endógenos, principalmente auxinas, giberelinas e citocininas, com destaque para a zeatina (BASRA et al., 2016). A presença de zeatina estimula a divisão celular e a diferenciação de gemas adventícias, favorecendo a brotação, enquanto o balanço com auxinas e giberelinas modula o alongamento celular e a rizogênese, processos essenciais para o desenvolvimento morfogenético (ARIF et al., 2023). Ainda, sua matriz bioquímica apresenta macro e micronutrientes essenciais, tais como nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn) e cobre (Cu) e compostos com atividade antioxidante e osmoprotetora, como as vitaminas A, B, C e E, fenóis, carotenoides e aminoácidos (OLIVIO et al., 2020). Esses constituintes atuam sinergicamente na mitigação do estresse oxidativo e na manutenção da integridade de membranas, otimizando o desenvolvimento vegetal (SOARES et al., 2021; GHARSALLAHA et al., 2023).

Considerando a relevância ecológica e ornamental de *C. nobilior* e o elevado custo para produção *in vitro* em larga escala, a utilização de bioestimulantes naturais, como o extrato foliar de *M. oleifera*, representa uma abordagem alternativa promissora para otimizar o crescimento de plantas micropropagadas e fortalecer estratégias de conservação *ex situ*. Essa abordagem também se alinha aos ODS 2, 12 e 15 da Agenda 2030, ao favorecer uma produção vegetal mais eficiente no uso de insumos e apoiar estratégias de conservação (ONU, 2015).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de extrato foliar de *M. oleifera* ao meio de cultivo, em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, sobre o desenvolvimento de *C. nobilior*, contribuindo para o aprimoramento de protocolos sustentáveis de propagação e conservação dessa espécie nativa do Cerrado. Nesse contexto, a hipótese deste estudo é que a suplementação do meio de cultivo com extrato de moringa promova incrementos no crescimento e vigor das plantas, e que esse efeito tende a ser mais expressivo no BIT, em razão do maior contato com nutrientes e melhores condições de aeração inerentes ao sistema.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo inicial

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultivo *in vitro* de Flores e Plantas Ornamentais (LCFPO) e no viveiro na área de Jardinocultura da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) (22°11'53.2" S; 54°56'02.3" W), Dourados – MS, Brasil.

Para o estudo, foram utilizadas plantas de *Cattleya nobilior* Rchb.f., obtidas a partir de germinação assimbiótica de cultivo *in vitro*. As sementes de *C. nobilior* foram provenientes de frutos maduros de plantas matrizes cultivadas em Orquidário da Faculdade de Ciências Agrárias da UFGD, coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50%, propiciando irradiância de 235 μmol m^{-2}s-1, sob condições médias de temperatura e umidade relativa de 22,6 ± 5 ºC e 73,9 ± 10%, respectivamente, com irrigação realizada por microaspersores tipo bailarina, posicionados a um metro acima das plantas, totalizando uma lâmina de água de 1 mm dia^{-1}.

Os frutos maduros foram colhidos e alocados no dissecador de vidro com sílica-gel durante um período de 14 dias e em seguida, armazenadas no banco de germoplasma do LCFPO sob refrigeração de 5 ± 1 ºC. Posteriormente, as sementes foram submetidas ao teste de tetrazólio, conforme metodologia proposta por Ribeiro et al. (2021). Após a confirmação da viabilidade, amostras de 0,005 g de sementes foram levadas para ambiente asséptico e desinfestadas com 15 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%, por 5 minutos. Em seguida, receberam tríplice lavagem com água destilada. Logo após, o volume da suspensão foi completado para 50 mL com água destilada estéril para a realização da semeadura *in vitro* (SOARES et al., 2020).

Na primeira etapa foi utilizado como meio de cultura para a germinação das sementes o meio MS de Murashige e Skoog (1962), na metade da concentração de sais (MS 1⁄2). O pH do meio foi aferido e ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave, realizada a 121°C por 20 minutos. A semeadura foi realizada com o auxílio do pipetador automático inoculando-se 1,0 mL da suspensão de sementes por frasco, e em seguida o material foi acondicionado em sala de crescimento com temperatura, irradiância e fotoperíodo controlados (25±2 °C; 18,9 μmol m^{-2} s^{-1}; 16 h, respectivamente) por 120 dias.

Cultivo *in vitro*

Decorridos 120 dias, para o início do experimento, foram utilizadas plantas com aproximadamente 1,0 ± 0,5 cm de comprimento, transferidas em ambiente asséptico para o meio MS (½) contendo diferentes concentrações de extrato de moringa (EM): 0,0; 12,5; 25,0; 37,5; ou 50,0 g L^{-1}, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose. As concentrações de extrato de moringa foram adaptadas de acordo com Nihayati et al. (2021). Em seguida, as plantas foram alocadas em dois sistemas de micropropagação: 1) Sistema de Cultivo Convencional (SCC); 2) Biorreator de Imersão Temporária (BIT) (Figura 2A).

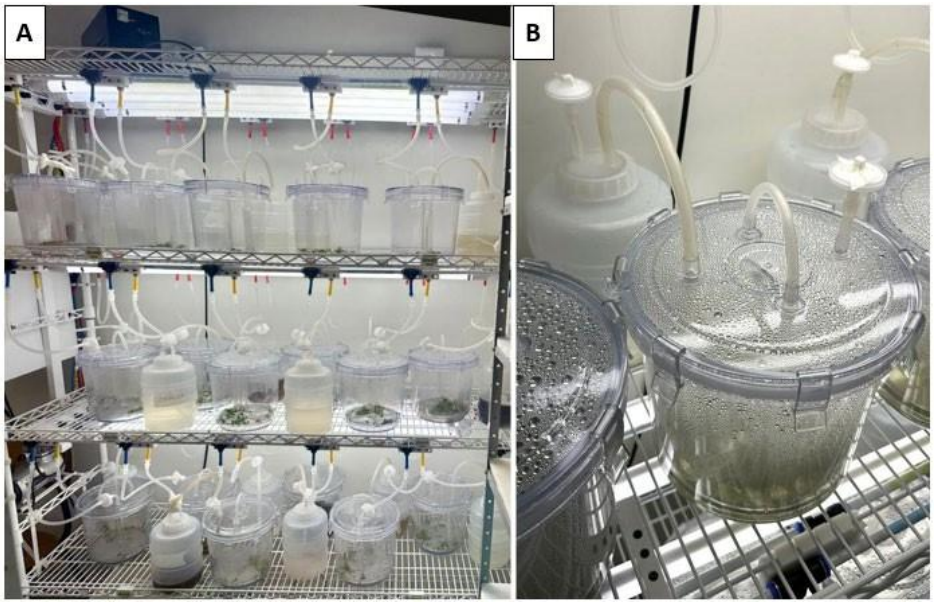


FIGURA 2. Biorreator de imersão temporária. A- Estrutura geral do BIT e B- Frasco de cultivo e reservado do meio de cultura do BIT. Foto: Peinado, R. B., 2026.

Para a confecção do EM, foi preparado conforme metodologia adaptada de Oliveira (2021). Foram coletadas folhas aleatórias de *Moringa oleifera* provenientes de árvores localizadas na Fazenda Experimental da UFGD (22°13'56.0"S 54°59'17.1"W). As folhas foram lavadas em água corrente para a remoção de impurezas físicas, e o excesso de água foi eliminado por secagem manual seguida do uso de papel toalha. Os folíolos foram destacados e acondicionados em sacos plásticos, sendo armazenados a -20 ºC.

Para a utilização desse material, as folhas foram descongeladas em ambiente refrigerado (5 ºC) por 24 horas. Em seguida foram pesadas amostras de 12,5 g; 25,0 g; 37,5 g ou 50,0 g e adicionadas em 1 L de água destilada aquecida a 94 °C. Os frascos

foram mantidos em estufa a 30 °C por 24 horas. Após esse período, o extrato aquoso de folhas de *Moringa oleifera* Lam. foi filtrado em papel filtro obtendo-se a solução utilizada nos tratamentos (Figura 3).

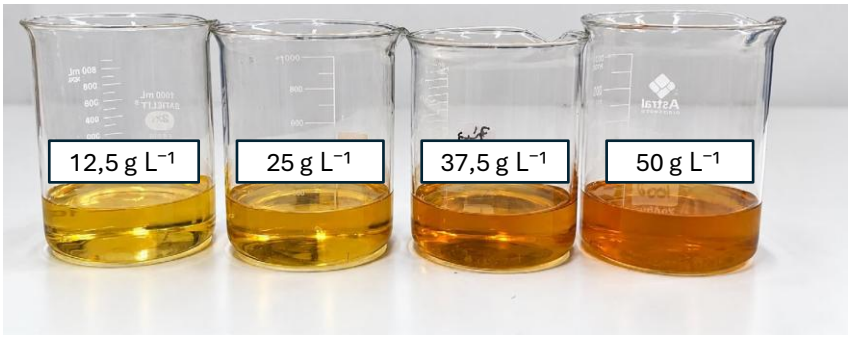


FIGURA 3. Extratos aquosos de folhas de *M. oleifera* nas concentrações de 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0 g L^{-1} utilizadas na suplementação do meio MS (½) para o cultivo *in vitro* de *Cattleya nobilior*. Dourados – MS, UFGD, 2026. Foto: Peinado, R. B., 2026.

No SCC, foram utilizados 75 mL de meio de cultura por frasco, solidificado com 7,0 g L^{-1} de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia) e inoculadas seis plantas por frasco (12,5 mL por planta), os frascos foram tampados com filme de cloreto de polivinila (PVC) perfurado e coberto com filtro de algodão. No BIT, constituído por frascos individuais, foram utilizados 750 mL do mesmo meio, sem agente geleificante, com ciclos de imersão programados de 5 min a cada 6 h. Sendo inoculadas 60 plantas por frasco, mantendo-se a proporção de 12,5 mL de meio por planta (Figura 2B).

Para todos os tratamentos, o pH foi aferido e ajustado para 5,8 utilizando-se hidróxido de potássio (KOH - 0,1M) ou ácido clorídrico (HCl - 1%) antes da esterilização em autoclave (121 °C e 1,1 atm de pressão), por 20 minutos. Em seguida as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com fotoperíodo, temperatura e irradiância controladas (16 horas; 25±2 °C; 18,9 µmol $m^{-2}s^{-1}$). Permanecendo nessas condições por 90 dias.

Decorrido este período, as plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente até total remoção do meio de cultivo e avaliadas quanto ao número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de brotos (NB), comprimento da maior folha (CMF) (mm), comprimento da maior raiz (CMR) (mm), comprimento da parte aérea

(CPA) (mm), comprimento total (CT) (CT = CPA + CMR) (mm), e massa fresca (MF) (g). Os tratamentos foram fotografados com câmera acoplada em mini estúdio fotográfico.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), organizado em esquema fatorial 2 × 5, correspondendo a dois sistemas de micropropagação (SCC e BIT) e cinco concentrações de extrato de *M. oleifera* (0,0; 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0 g L^{-1}). Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo a unidade experimental representada por um frasco de cultivo. Variáveis biométricas foram mensuradas em todas as plântulas de cada frasco, e os dados foram consolidados como a média da unidade experimental para fins de análise.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) por meio do teste F ($p \leq 0,05$). Quando constatada significância, o efeito do fator quantitativo (concentrações do extrato) foi avaliado por meio de análise de regressão polinomial (modelos linear e quadrático; $p \leq 0,05$). Quando a interação sistema × concentração se mostrou significativa, procedeu-se ao seu desdobramento, ajustando-se os modelos de regressão separadamente para cada sistema de cultivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo da interação entre as concentrações de *Moringa oleifera* (0; 12,5; 25; 37,5; 50 g L^{-1}) e os sistemas de cultivo (convencional e BIT) para as variáveis número de folhas (NF), massa fresca (MF, g), comprimento da maior folha (CMF, mm), da maior raiz (CMR, mm), da parte aérea (CPA, mm) e total (CT, mm). A análise de variância também evidenciou o efeito significativo isolado das concentrações de moringa sobre o número de raízes (NR). Os fatores estudados não influenciaram a variável número de brotos (NB), apresentando média geral de 0,43 brotos (QUADRO 1).

QUADRO 1. Resumo da análise de variância de número de folhas (NF), massa fresca (MF, g), comprimento da maior folha (CMF, mm), comprimento da maior raiz (CMR, mm), comprimento da parte aérea (CPA, mm), comprimento total (CT, mm) número de raízes (NR), e número de brotos (NB) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos (convencional e BIT) e diferentes concentrações de extrato de *Moringa oleifera* Lam. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

F. V	GL	.....Pr > Fc.....			
		NF	MF	CMF	CMR
Sistemas	1	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Concentração	4	0,0000*	0,0000*	0,0001*	0,0000*
Sistemas x Concentração	4	0,0000*	0,0000*	0,0026*	0,0000*
Total		1142,66	2,10	692,93	16219,53
Média Geral		5,96	0,165	5,93	26,36
C.V. (%)		12,24	2,58	10,38	10,39

F. V	GL	.....Pr > Fc.....			
		CPA	CT	NR	NB
Sistemas	1	0,0000*	0,0000*	0,1893^{ns}	0,1380ns
Concentração	4	0,0000*	0,0000*	0,0212*	0,0617ns
Sistemas x Concentração	4	0,0002*	0,0000*	0,0579^{ns}	0,5504ns
Total		994,66	25152,51	538,25	150,93
Média Geral		6,86	33,21	5,63	0,43
C.V. (%)		10,01	10,87	11,29	23,96

F. V: fator de variação; C.V (%): coeficiente de variação; Pr > Fc: probabilidade maior que F calculado; GL: grau de liberdade; *: significativo; ^{ns}: não significativo.

Para a variável número de folhas (NF), foi observado efeito significativo entre os fatores sistema de cultivo e concentrações de *Moringa oleifera*. No sistema de cultivo BIT o maior valor encontrado (8,71 folhas) foi na concentração de 50 g L^{-1}, já no sistema convencional a concentração de 37,5 g L^{-1} apresentou o valor estimado de 5,7 folhas (FIGURA 4).

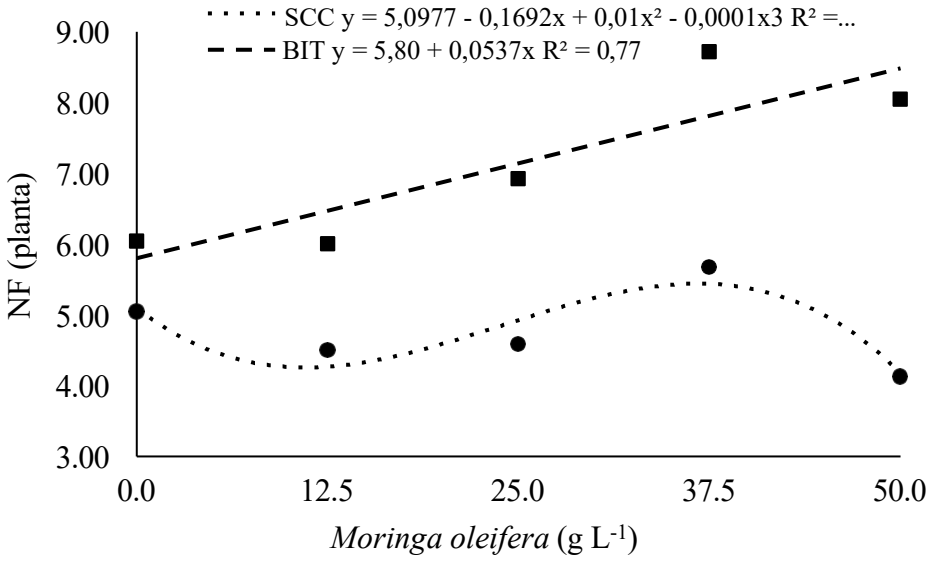


FIGURA 4. Número de folhas (NF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos e diferentes concentrações de extrato de *Moringa oleifera* Lam. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

Quanto a massa fresca (MF), o sistema de cultivo BIT apresentou o maior valor de 0,2904 g utilizando a concentração de 50 g L^{-1}. No sistema de cultivo convencional, não houve efeito significativo, sendo observado média de 0,103 g (FIGURA 5).

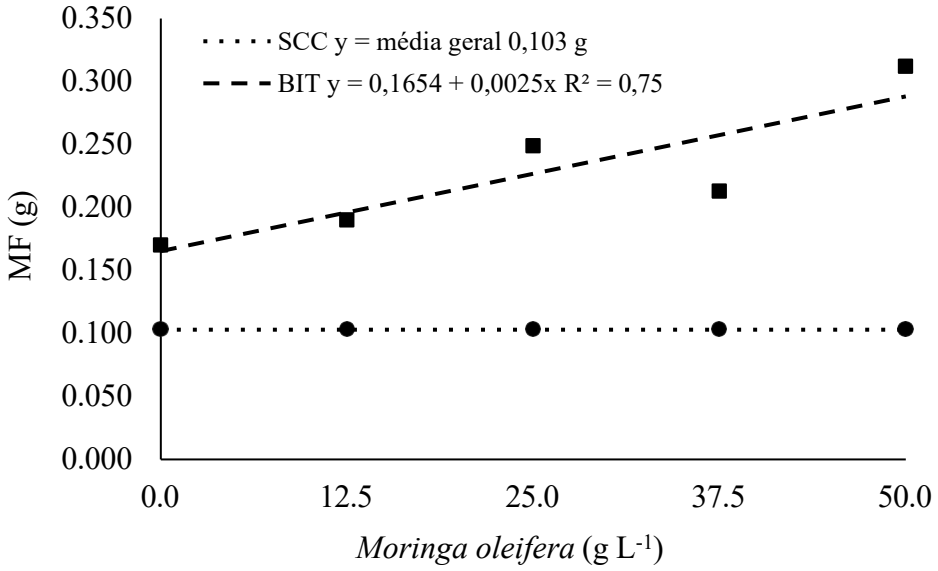


FIGURA 5. Massa fresca (MF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos e diferentes concentrações de extrato de *Moringa oleifera* Lam. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

O comprimento da maior folha (CMF), no sistema BIT o valor máximo estimado foi 7,01 mm na concentração de 36,16 g L^{-1}. Já no sistema de cultivo convencional a concentração de 50 g L^{-1} apresentou o maior comprimento de folha (5,42 mm) (FIGURA 6).

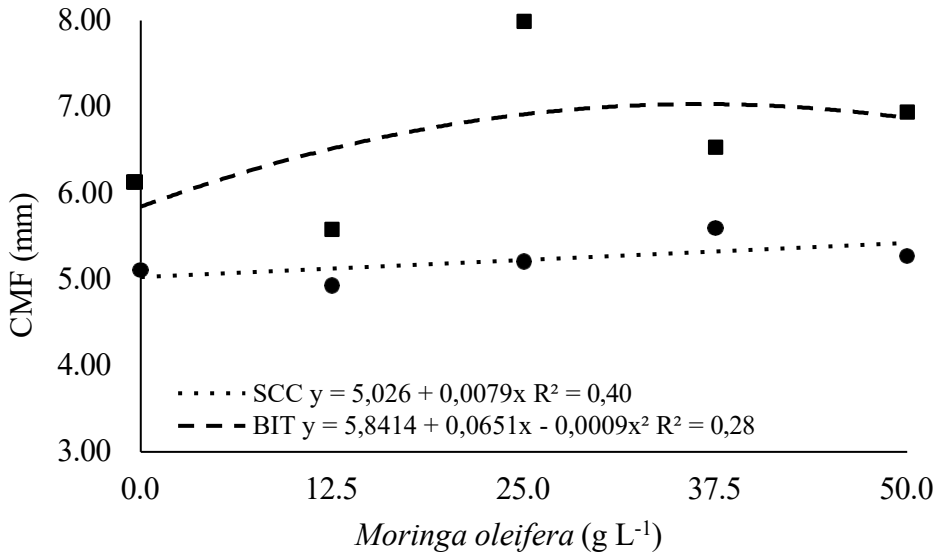


FIGURA 6. Comprimento da maior folha (CMF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos e diferentes concentrações de extrato de *Moringa oleifera* Lam. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

Para o comprimento da maior raiz (CMR), a concentração de 50 g L^{-1} apresentou o maior comprimento de raiz, tanto no sistema de cultivo BIT quanto no convencional, sendo observadas raízes de 36,63 e 26,04 mm, respectivamente (FIGURA 7).

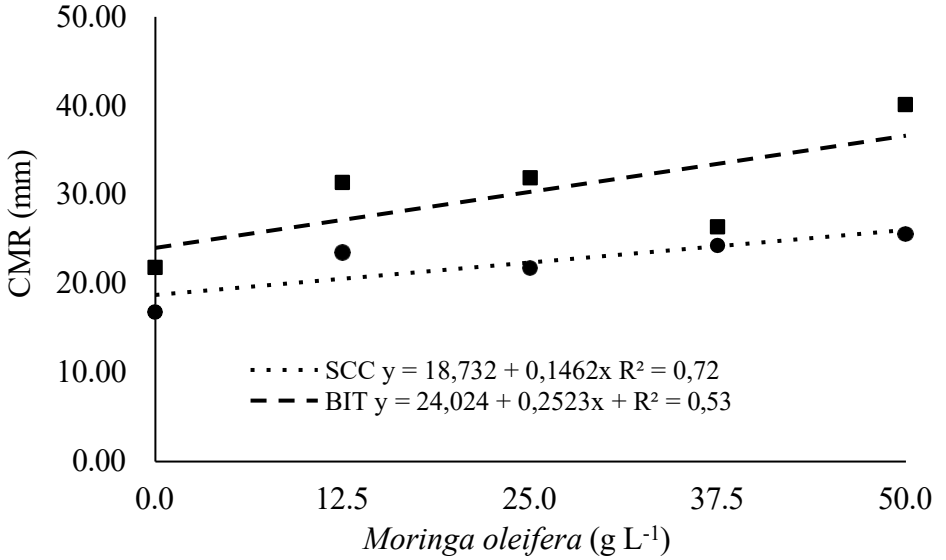


FIGURA 7. Comprimento da maior raiz (CMR) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos e diferentes concentrações de extrato de

Moringa oleifera Lam. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

Para o comprimento da parte aérea (CPA), o sistema de cultivo BIT apresentou 8,82 mm de comprimento, utilizando a concentração de 35,11 g L^{-1}. Para o sistema de cultivo convencional, não houve efeito significativo, apresentando média geral de 5,78 mm (FIGURA 8).

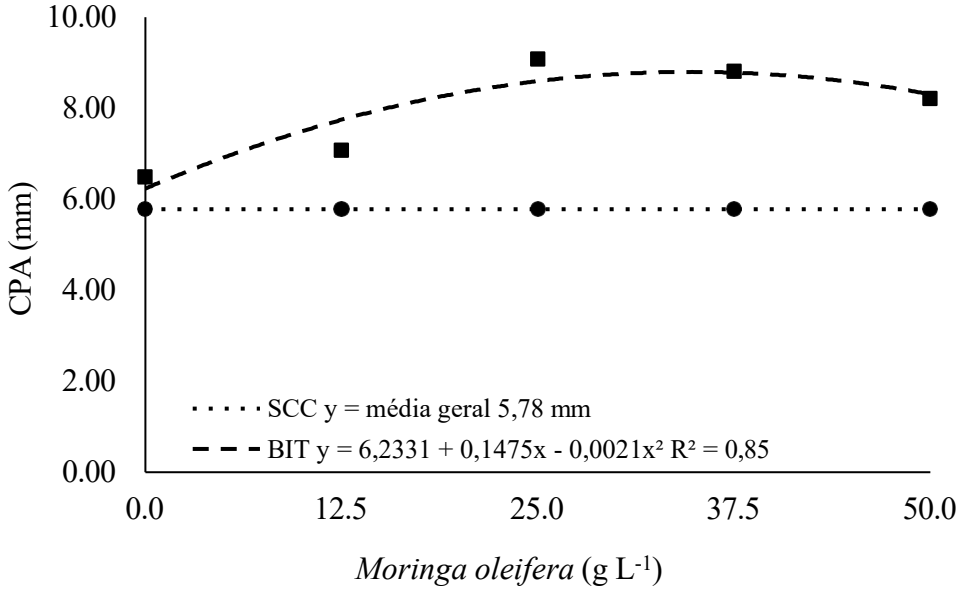


FIGURA 8. Comprimento da parte aérea (CPA) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos e diferentes concentrações de extrato de *Moringa oleifera* Lam. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

Na variável comprimento total (CT), o sistema de cultivo BIT, utilizando a concentração de 50 g L^{-1} de extrato de moringa apresentou 45,19 mm de comprimento total. Já no sistema de cultivo convencional a concentração de 45,29 g L^{-1} apresentou o maior comprimento total, com 30,75 mm (FIGURA 9).

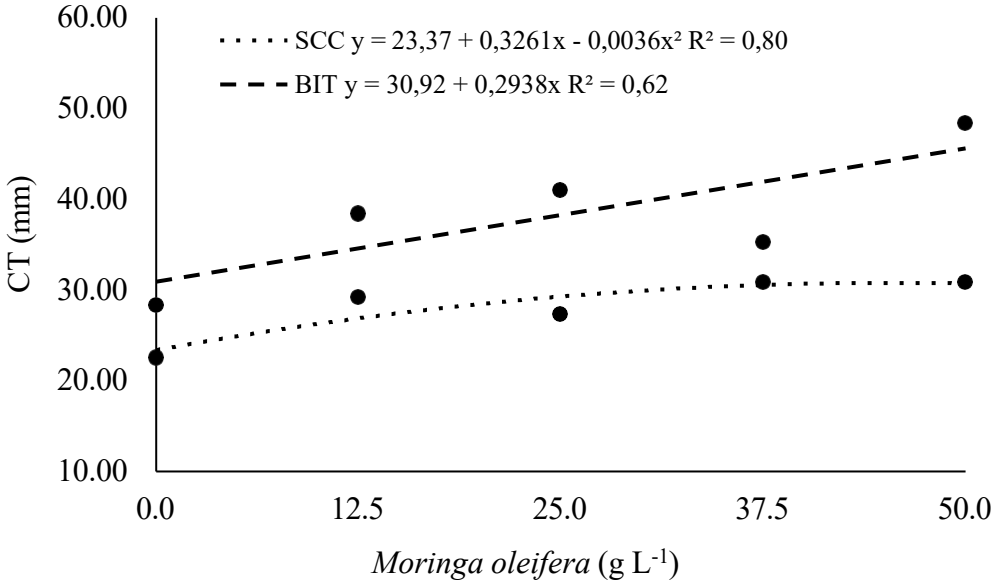


FIGURA 9. Comprimento total (CT) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos e diferentes concentrações de extrato de *Moringa oleifera* Lam. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

Quanto ao efeito isolado das concentrações do extrato de *M. oleifera* para o número de raízes (NR), o maior valor de raízes (6,06) foi observado na ausência desse bioestimulante (FIGURA 10).

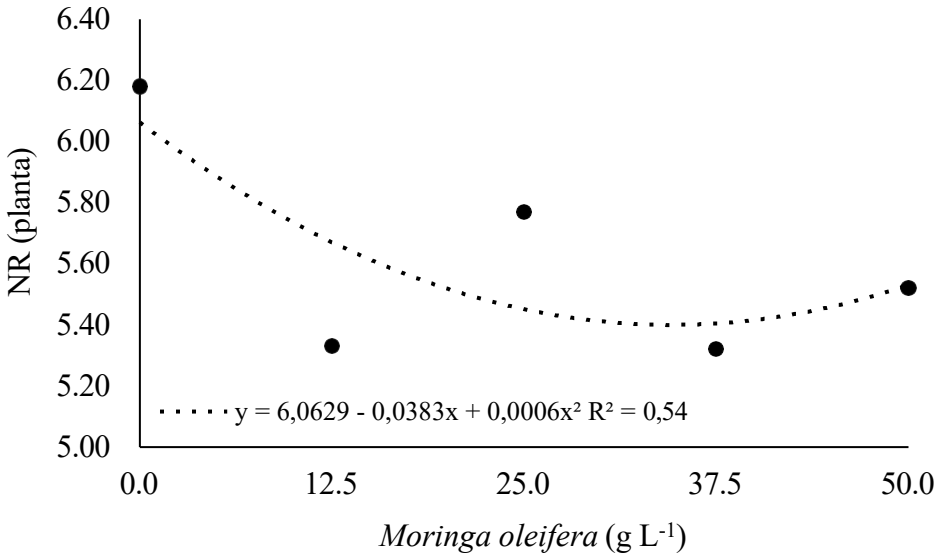


FIGURA 10. Número de raízes (NR) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes concentrações de extrato de *Moringa oleifera* Lam. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

De modo geral, o sistema de cultivo BIT apresentou desempenho superior ao SCC para a maioria das variáveis de crescimento avaliadas, como pode ser observado na Figura 11. Em sistemas de imersão temporária, a alternância entre contato com o meio e fase de drenagem tende a favorecer maior oxigenação, reduzir a ocorrência de hiperidricidade, aumentar a difusão de gases e otimizar o contato do explante com nutrientes, reduzindo estresses fisiológicos no cultivo *in vitro* e favorecendo o crescimento e o acúmulo de biomassa (ONTANEDA et al., 2020; NONGDAM et al., 2023; VENDRAME et al., 2023). Esse desempenho superior do BIT tem sido relatado para diferentes orquídeas cultivadas *in vitro*, tais como: *Mokara* leuenberger (MINH, 2022), *Cattleya tigrina* A.Rich. (FRITSCHE et al., 2022), *Brassavola nodosa* (L.) Lindl. (VENDRAME et al., 2023), *Coelogyne pandurata* Lindl., (RAHAYU et al., 2023), *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins (HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2024), *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr. (LÓPEZ-ESCAMILLA et al., 2024), Vanda *celebica* Rolfe (LAILY et al., 2024), *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume (BAROUGH et al., 2024) e *Cattleya nobilior* Rchb.f. (NUNES et al., 2025), e *Rhyncattleanthe* Queen Bee ‘JLA 1’ (*Rhyncholaeliocattleya Hwa Yuan*

Grace × *Cattlianthe Chocolate Drop*.) (SOLANO-RODRÍGUEZ et al., 2025), reforçando a aplicabilidade do sistema para micropropagação em escala.

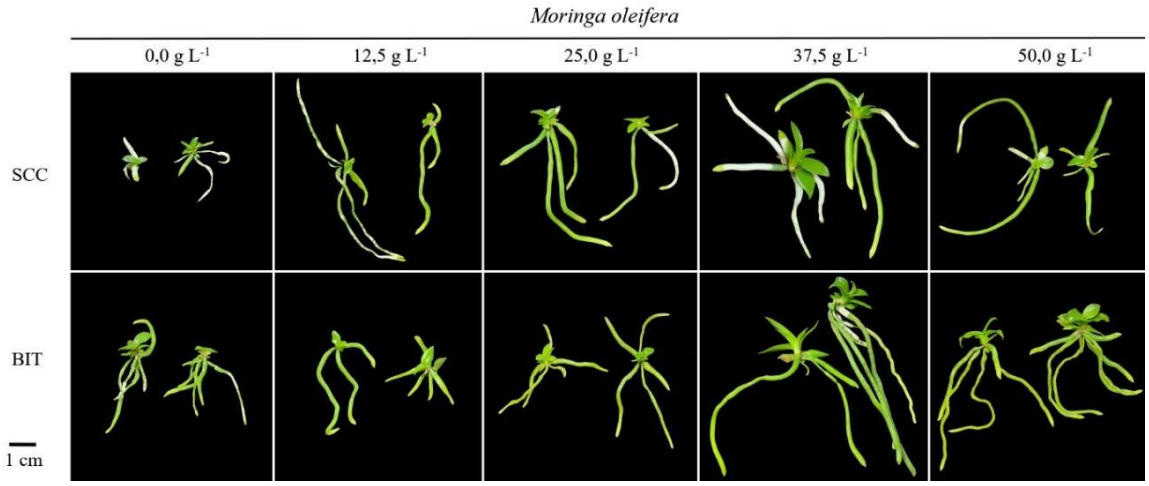


FIGURA 11. Plantas de *Cattleya nobilior* Rchb.f. em função de diferentes sistemas de cultivos e diferentes concentrações de extrato de *Moringa oleifera* Lam. após 90 dias de cultivo *in vitro*. SCC = sistema de cultivo convencional; BIT = biorreator de imersão temporária. Dourados – MS, UFGD, 2026.

No BIT, a maior oxigenação da zona radicular e a maior disponibilidade de nutrientes podem explicar o desempenho superior observado neste estudo. Assim, os resultados obtidos para *C. nobilior* indicam que o BIT constitui uma alternativa viável não apenas para produção comercial, mas também para conservação *ex situ*, uma vez que permite a propagação em larga escala, com potencial aumento de eficiência do processo, conforme discutido por Nunes et al. (2025).

Os resultados também demonstraram que a adição de extrato foliar de *M. oleifera* ao meio de cultivo promoveu o crescimento das plantas de *C. nobilior*, sobretudo quando associado ao BIT. Sugere-se que esse efeito positivo possa ser atribuído à ação sinérgica dos compostos bioativos presentes no extrato, uma vez que *M. oleifera* é rica em fitormônios endógenos, incluindo auxinas, giberelinas e citocininas, como a zeatina, que podem ter influenciado o metabolismo dessa orquídea. Embora descritos predominantemente em culturas anuais (BASRA et al., 2016), esses reguladores atuam em vias conservadas do desenvolvimento vegetal. Nesse contexto, infere-se que, para a espécie estudada, a zeatina e outras citocininas presentes no extrato possam ter estimulado

a divisão celular nos meristemas, enquanto o balanço com auxinas e giberelinas teria favorecido a elongação dos tecidos, contribuindo para o maior comprimento de folhas e raízes observados.

Ainda, o aporte de nutrientes essenciais como, nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), micronutrientes e vitaminas (A, B, C e E) em formas orgânicas de rápida assimilação pode ter contribuído para o melhor desempenho nutricional das plantas. O cálcio e o potássio, por exemplo, são fundamentais para a regulação osmótica e a integridade da parede celular, o que pode ter favorecido o turgor e a estruturação das plântulas. Além disso, a presença de compostos com atividade antioxidante e osmoprotetora, tais como fenóis, carotenoides, ácido ascórbico e aminoácidos (SOARES et al., 2021; ARIF et al., 2023), pode ter desempenhado papel relevante na proteção do aparato fotossintético contra o estresse oxidativo típico do ambiente *in vitro*, auxiliando na preservação da funcionalidade das membranas celulares e na otimização da taxa metabólica.

O alto teor de proteínas presente na *M. oleifera* também pode ter contribuído para a expansão do protoplasma celular e metabolismo vegetal, ao disponibilizar esqueletos de carbono e nitrogênio para a síntese de novas estruturas (IQBAL et al., 2020; DOLCE et al., 2020; MACHADO & ZAMARIAN, 2020). Ainda, infere-se que esse extrato possa atuar na mitigação de estresses por meio do aumento da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, POX) e do acúmulo de osmólitos, como açucares solúveis e aminoácidos, que auxiliam na manutenção do equilíbrio osmótico celular. Tal mecanismo, embora relatado predominantemente em outras espécies (ARIF et al., 2023), assume relevância para orquídeas de crescimento lento como *C. nobilior*, podendo favorecer a estabilidade celular necessária para o acúmulo contínuo de biomassa ao longo do período de cultivo.

Esses processos fisiológicos e bioquímicos refletiram no crescimento das plantas, conforme observado neste trabalho nas concentrações entre 37,5 e 50 g L^{-1} de *M. oleifera*. Esses resultados também podem estar relacionados com o maior acúmulo de água e solutos, devido ao aumento da fotossíntese e a melhoria do metabolismo do carbono e do nitrogênio (YASMEEN et al., 2013; MASHAMAITE et al., 2022). Além disso, a literatura aponta que os efeitos do extrato foliar de moringa podem ser dependentes da concentração, variando conforme espécie e condição de cultivo, o que reforça a importância de definir faixas adequadas de aplicação em protocolos específicos (ARIF et al., 2023).

A maior média obtida no tratamento sem extrato de *M. oleifera* para o número de raízes sugere que as concentrações utilizadas podem ter direcionado os biocompostos para o crescimento radicular e parte aérea, em detrimento da formação de novas raízes. Esses resultados corroboram com os de Wagan et al. (2025), que ao estudar o efeito do extrato de moringa no cultivo de *Hibiscus rosa-sinensis* L. também observaram a promoção do crescimento estrutural das raízes, especialmente o desenvolvimento do colo da raiz. Os autores relataram que este processo é importante para a estabilidade radicular e a absorção de nutrientes. Ainda assim, mesmo com menor número de raízes, o comprimento radicular foi superior no tratamento utilizando a maior concentração (50 g L^{-1}) de extrato de moringa, demonstrando que o estímulo proporcionado por esse bioestimulante favoreceu raízes maiores, uma característica fundamental para a sobrevivência e fixação durante a fase de aclimatização *ex vitro (*UMA et al., 2023; GRZELAK et al., 2024).

Dessa forma, os resultados evidenciam o potencial do extrato de *M. oleifera* não apenas como fonte natural de reguladores, mas também como suplemento nutricional alternativo, capaz de substituir parcialmente aditivos sintéticos e reduzir custos, alinhando-se a protocolos de micropropagação mais sustentáveis e acessíveis (NIHAYATI et al., 2021; MARDIANA & SUMARJI, 2021; DE STEFANO et al., 2022; HAMDENI et al., 2022; RATHNAYAKA et al., 2023).

De modo geral, os resultados deste estudo confirmam que a combinação de extrato foliar de *M. oleifera* com sistemas de imersão temporária representa uma abordagem tecnicamente viável e consistente para a micropropagação de *C. nobilior*. Além de demonstrar ganhos morfofisiológicos, o uso desse bioestimulante natural oferece uma alternativa ecológica e econômica para programas de conservação e produção comercial de orquídeas nativas do Cerrado tais como *C. nobilior*.

CONCLUSÃO

A suplementação do meio de cultivo com 37,5 a 50 g L^{-1} de extrato foliar de *Moringa oleifera* Lam. no sistema BIT promoveu os maiores ganhos em biomassa e desenvolvimento morfométrico de *Cattleya nobilior* Rchb.f. em cultivo *in vitro*. Esses resultados validam o uso deste bioestimulante natural em protocolos de micropropagação mais eficientes e sustentáveis, com potencial aplicação na produção comercial em larga escala e em estratégias de conservação *ex situ* desta espécie nativa do Cerrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIF, Y.; BAJGUZ, A.; HAYAT, S. *Moringa oleifera* extract as a natural plant biostimulant. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 3, p. 1291-1306, 2023.

BAROUGH, A. M.; DAYLAMI, S. D.; FADAVI, A.; ALINIAEIFARD, S.; VAHDATI, K. Enhancing photosynthetic efficiency in *Phalaenopsis amabilis* through bioreactor innovations. **BMC Plant Biology**, v. 24, n. 1, p. 1166, 2024.

BRASIL. Estado de Mato Grosso do Sul. **Lei Ordinária nº 5.316, de 4 de janeiro de 2019.** Designa a orquídea *Cattleya nobilior* como flor símbolo do Estado de Mato Grosso do Sul e da outras providências. Diário Oficial do Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, n. 9.814, p. 1, 7 jan. 2019.

BASRA, S. M.; LOVATT, C. J. Exogenous applications of moringa leaf extract and cytokinins improve plant growth, yield, and fruit quality of cherry tomato. **HortTechnology**, v. 26, n. 3, p. 327-337, 2016.

BULLOUGH, L. -A.; NGUYÊN, N.; DRURY, R.; HINSLEY, A. Orchid obscurity: understanding domestic trade in wild-harvested orchids in Viet Nam. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, p. 631795, 2021.

DE STEFANO, D.; COSTA, B. N. S.; DOWNING, J.; FALLAHI, E.; KHODDAMZADEH, A. *In-vitro* micropropagation and acclimatization of an endangered native orchid using organic supplements. **American Journal of Plant Sciences**, v. 13, n. 3, p. 380-393, 2022.

DOLCE, N. R.; MEDINA, R. D.; TERADA, G.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; FLACHSLAND, E. A. In vitro propagation and germplasm conservation of wild orchids from South America. In: KULL, T.; ARDITTI, J. **Orchid Biology: recent trends and challenges**. Singapore: Springer, 2020. p. 37–94.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. Orchidaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB11329\>. Acesso em: 12 jan. 2026.

FREITAS, K. G. D.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M. *In vitro* growth of *Cattleya nobilior* Rchb. f.: culture media, sealing systems and irradiance. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, p. e67131, 2021.

FRITSCHE, Y.; PINHEIRO, M. V. M.; GUERRA, M. P. Light quality and natural ventilation have different effects on protocorm development and plantlet growth stages of the *in vitro* propagation of *Epidendrum fulgens*. **South African Journal of Botany**, v. 146, p. 864-874, 2022.

GHARSALLAH, K.; REZIG, L.; RAJOKA, M. S. R.; MEHWISH, H. M.; ALI, M. A.; CHEW, S. C. *Moringa oleifera*: processing, phytochemical composition, and industrial applications. **South African Journal of Botany**, v. 160, p. 180-193, 2023.

GRZELAK, M.; PACHOLCZAK, A.; NOWAKOWSKA, K. Challenges and insights in the acclimatization step of micropropagated woody plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 159, n. 3, p. 72, 2024.

HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, E.; LÓPEZ-AGUILAR, D. R.; ORDUÑO-CRUZ, A.; ZETINA-CÓRDOBA, P.; RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A. Micropropagation of *Guarianthe skinneri* in temporary immersion bioreactors. In: **Micropropagation methods in temporary immersion systems**. New York: Springer, 2024. p. 149–156.

IQBAL, J.; IRSHAD, J.; BASHIR, S.; KHAN, S.; YOUSAF, M.; SHAH, A. N. Comparative study of water extracts of Moringa leaves and roots to improve the growth and yield of sunflower. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 221-224, 2020.

KISVARGA, S.; FARKAS, D.; BORONKAY, G.; NEMÉNYI, A.; ORLÓCI, L. Effects of biostimulants in horticulture, with emphasis on ornamental plant production. **Agronomy**, v. 12, n. 5, p. 1043, 2022.

KUMAR, A.; CHAUHAN, S.; RATTAN, S.; WARGHAT, A. R.; KUMAR, D.; BHARGAVA, B. *In vitro* propagation and phyto-chemical assessment of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: an orchid of pharma-horticultural importance. **South African Journal of Botany**, v. 144, p. 261-269, 2022.

KUMAR, J.; KATOCH, D.; THAKUR, A.; PATHANIA, A.; ANAND, A.; CHOUDHARY, K; SHELJA. A. comprehensive review on threats and conservation status of orchids. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, 12(2), 43-47, 2024.

KUMARI, M.; SWARUPA, P.; KESARI, K. K.; KUMAR, A. Microbial inoculants as plant biostimulants: a review on risk status. **Life**, v. 13, n. 1, p. 12, 2022.

LAILY, A. N.; MAHARIJAYA, A.; WULANDARI, D. R.; PUSPITANINGTYAS, D. M.; ARIATI, S. R.; MARTIN, A. F.; HAPSARI, B. W. Optimizing micropropagation of Indonesian conserved orchid *Vanda celebica* using organic compounds and a temporary immersion system. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 52, n. 4, p. 14065, 2024.

LIU, Q.; WU, X.; XING, H.; CHI, K.; WANG, W.; SONG, L.; XING, X. Orchid diversity and distribution pattern in karst forests in eastern Yunnan Province, China. **Forest Ecosystems**, v. 10, p. 100117, 2023.

LÓPEZ-ESCAMILLA, A. L.; BADILLO-HUERTA, V.; RODRÍGUEZ-CUAMATZI, P.; GARCÍA-DÁVILA, J.; SÁNCHEZ-MINUTTI, L. Bioactive compounds in *Laelia speciosa* (Orchidaceae) seedlings grown in temporary immersion bioreactor. **Mexican Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 19-32, 2024.

MACHADO, W.; ZAMARIAN, A. S. Polpa de banana, água de coco e carvão ativado no desenvolvimento *in vitro* de *Lycaste* sp. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 24, p. 159-163, 2020.

MARDIANA, Y.; SUMARJI, S. Utilization of moringa leaves to improve the quality of orchid explants through tissue culture techniques. In: **Prosiding Seminar**, 2021. p. 1–12.

MASHAMAITE, C. V.; NGCOBO, B. L.; MANYEVERE, A.; BERTLING, I.; FAWOLE, O. A. Assessing the usefulness of *Moringa oleifera* leaf extract as a biostimulant to supplement synthetic fertilizers: a review. **Plants**, v. 11, n. 17, p. 2214, 2022.

MINH, T. V. Micropropagação da orquídea Mokara pela técnica de sistema de imersão temporária. **International Journal of Research and Innovation in Applied Science**, v. 7, n. 5, p. 54–58, 2022.

MIRZABE, A. H.; HAJIAHMAD, A.; FADAVI, A.; RAFIEE, S. Temporary immersion systems (TISs): a comprehensive review. **Journal of Biotechnology**, v. 357, p. 56–83, 2022.

MOHAMMADPOUR BAROUGH, A.; DIANATI DAYLAMI, S.; FADAVI, A.; VAHDATI, K. Enhancing *Phalaenopsis* orchid production: a comparative study of permanent and temporary immersion bioreactors. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 60, n. 4, p. 523–537, 2024.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NIHAYATI, E.; NAJAH, M. W. Comparative assessment of the effect of *Moringa oleifera* leaf extract (MLE) and zeatin on *in vitro* regeneration response of *Pogostemon cablin* bud explants. **AIMS Agriculture and Food**, v. 6, n. 1, p. 308–320, 2021.

NONGDAM, P.; BELESKI, D. G.; TIKENDRA, L.; DEY, A.; VARTE, V.; EL MERZOUGUI, S.; PEREIRA, V. M.; BARROS, P. R.; VENDRAME, W. A. Orchid micropropagation using conventional semi-solid and temporary immersion systems: a review. **Plants**, v. 12, n. 1136, 2023.

NUNES, G. P.; SORGATO, J. C.; RAMOS, J. C. M.; SOARES, J. S.; REZENDE, R. K. S.; PEINADO, R. B. Innovations in micropropagation of the orchid *Cattleya nobilior*: the effect of bioreactor and enriched culture media. **Ciência Rural**, v. 55, n. 6, e20240271, 2025.

OLIVEIRA, I. **Extratos aquosos de folhas secas e frescas de moringa sob parâmetros de fermentação ruminal *in vitro***. 2021. 72 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS.

OLIVIO, M. L. G.; ESTEVES, E. F. J.; FERRO, D. A. M. Sementes de *Moringa oleifera* Lam.: eficiência no uso de coagulante biológico no tratamento de água com turbidez, comparado ao coagulante químico sulfato de alumínio. **FUNEC Científica – Multidisciplinar**, v. 9, n. 11, p. 1–18, 2020.

ONTANEDA, A. L. C.; HERRERA, A. M.; BATISTA, R. M. G. Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional *in vitro*. **Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas**, v. 3, n. 2, p. 173–182, 2020.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). Transformando nosso mundo: a Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável. Nova York: ONU, 2015. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs> . Acesso em: 16 jan. 2026.

OSTETTO, S. **Orquídeas de Mato Grosso do Sul**. Campo Grande: Alvorada, 2015. 141 p.

PADMAJA, V. V.; PAVANI, K.; SRILATHA, P.; LALITHA, K.; SARADA, G.; NAIK, M. R.; KIRAN, Y. D.; GOPAL, K. Role of biostimulants in horticulture: a review. **International Journal of Environment and Climate Change**, v. 13, n. 8, p. 1146–1157, 2023.

PEIXOTO, R. S.; VOOLSTRA, C. R.; SWEET, M.; DUARTE, C. M.; CARVALHO, S.; VILLELA, H.; LUNSHOF, J. E.; GRAM, L.; WOODHAMS, D. C.; WALTER, J.; ROIK, A.; HENTSCHEL, U.; THURBER, R. V.; DAISLEY, B.; USHIJIMA, B.; DAFFONCHIO, D.; COSTA, R.; KELLER-COSTA, T.; BOWMAN, J. S.; ROSADO, A. S.; REID, G.; MASON, C. E.; THOMAS, T.; BERG, G. Harnessing the microbiome to prevent global biodiversity loss. **Nature Microbiology**, London, v. 7, p. 1726–1735, 2022.

RAHAYU, A. D.; UMAMI, L. A.; CEN, S. A. A.; ABDUSSHAMAD, B. R.; SEAN, L.; BUDIMAN, K.; KURNIAWAN, L.; MUFLIKHUN, M. A.; MUSTIKA, I. W.; SEMIARTI, E. Development of automatic dual sequence control temporary immersion bioreactor systems for micropropagation *Coelogyne pandurata* Lindl. In: **BIO WEB OF CONFERENCES**. Les Ulis: EDP Sciences, 2023. p. 06002.

RATHNAYAKA, R. M. C.; HERATH, H. M.; MUBARAK, A. N.; NASHATH, M. N. Exploring the potential use of *Moringa olifera* Lam and *Azadirachta indica* additives in Orchid tissue culture. **Sri Lanka Journal of Technology**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2023.
RIBEIRO, L. M.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; RAMOS, J. C. M. Methodology of the tetrazolium test for identifying viable seeds of orchids of the genus *Cattleya* native to the Brazilian Cerrado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, p. 1351–1360, 2021.

SINGER, R. B.; BUZATTO, C. R.; FARIAS-SINGER, R.; MACHADO-NETO, N. B.; CUSTODIO, C. C.; PRENDERGAST, K. You don't have to kill the orchids—Good practices in orchid research. **Iheringia, Série Botânica**, v. 79, p. e20241356, 2024.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; TATARA, M. B.; SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R. Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 35, p. 2275-2284, 2014.
SOARES, J. S.; SORGATO, J. C.; RIBEIRO, L. M. Protocol for asymbiotic germination and initial protocorm development of Brazilian Cerrado native orchids. **Rodriguésia**, v. 71, e01332018, 2020.

SOARES, T. F. S. N.; DA SILVA, A. V. C.; MUNIZ, E. N. Moringa leaf extract: a cost-effective and sustainable product to improve plant growth. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 171–176, 2021.

SOLANO-RODRÍGUEZ, L. A.; GALINDO-TOVAR, M. E.; CASTAÑEDA-CASTRO, O.; HIDALGO-CONTRERAS, J. V.; MURGUÍA-GONZÁLEZ, J.; CUATRA-

XICALHUA, G. L.; VIÁN-PÉREZ, J. G.; MENDOZA DEL ÁNGEL, M.; PASTELÍN-SOLANO, M. C. *In Vitro* Cultivation of the Orchid Hybrid *Rhyncattleanthe Queen* Bee JLA 1 and Its Propagation Under Different Systems. **Horticulturae**, v. 11, n. 7, p. 722, 2025.

TICKTIN, T.; CHARITONIDOU, M.; DOUGLAS, J.; HALLEY, J. M.; HERNÁNDEZ-APOLINAR, M.; LIU, H.; MONDRAGÓN, D.; PÉREZ-GARCÍA, E. A.; TREMBLAY, R. L.; PHELPS, J. Wild orchids: A framework for identifying and improving sustainable harvest. **Biological Conservation**, v. 277, p. 109816, 2023.

UMA, S., KARTHIC, R., KALPANA, S., BACKIYARANI, S. Evaluation of temporary immersion bioreactors for *in vitro* micropropagation of banana (*Musa* spp.) and genetic fidelity assessment using flow cytometry and simple-sequence repeat markers. **South African Journal of Botany**, v. 157, p. 553-565, 2023.

VENDRAME, A. W.; XU, J.; BELESKI, D. G. Micropropagation of *Brassavola nodosa* (L.) Lindl. Using SETISTM bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 153, n. 1, p. 67-76, 2023.

WAGAN, A. M. et al. The effect of moringa leaf extract (MLE) on sprouting and growth responses of stem cuttings of China rose (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). **International Congresses of Turkish Science and Technology Publishing**, p. 1074–1081, 2025.

WFO - WORLD FLORA ONLINE. Orchidaceae Juss. Disponível em: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-7000000429 >. Acesso em: 06 jan. 2026.

YASMEEN, A.; BASRA, S. M. A.; FAROOQ, M.; REHMAN, H. U.; HUSSAIN, N.; ATHAR, H. U. R. Exogenous application of moringa leaf extract modulates the antioxidant enzyme system to improve wheat performance under saline conditions. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 69, n. 3, p. 225–233, 2013.

ZULFIQAR, F.; CASADESÚS, A.; BROCKMAN, H.; MUNNÉ-BOSCH, S. An overview of plant-based natural biostimulants for sustainable horticulture with a particular focus on moringa leaf extracts. **Plant Science**, v. 295, p. 110194, 2020
.

CAPÍTULO ll - *Chlorella* sp. NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Cattleya nobilior* Rchb.f.

RESUMO

A micropropagação de orquídeas representa uma estratégia essencial para a conservação *ex situ* e a produção comercial de espécies nativas ameaçadas, como *Cattleya nobilior* Rchb.f., espécie nativa do Cerrado brasileiro e da Floresta Amazônica. A busca por alternativas sustentáveis e de baixo custo para otimização dos protocolos de cultivo *in vitro* tem impulsionado o uso de suplementos orgânicos e bioestimulantes, entre os quais se destacam as microalgas. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de biomassa seca de *Chlorella* sp., em diferentes concentrações, associada a distintos sistemas de cultivo *in vitro*, sobre o crescimento de *C. nobilior*. Plantas oriundas de germinação assimbiótica foram cultivadas em meio MS (½) suplementado com 0,0; 0,15; 0,30; 0,45 e 0,60 g L^{-1} de biomassa de *Chlorella* sp., em sistema de cultivo convencional (SCC) e em biorreator de imersão temporária (BIT). Após 90 dias de cultivo, foram avaliadas as variáveis número de folhas, número de raízes, número de brotações, massa fresca, comprimento da maior folha, da maior raiz, da parte aérea e comprimento total. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 × 5 (dois sistemas de micropropagação e cinco concentrações de *Chlorella* sp.), com quatro repetições. Os resultados evidenciaram efeito significativo da interação entre sistemas de cultivo e concentrações da microalga para a maioria das variáveis analisadas, com desempenho superior do BIT em relação ao SCC. A suplementação com biomassa de *Chlorella* sp. apresentou maiores valores de brotações, número de folhas e comprimento da parte aérea, porém restringindo o crescimento vegetativo em concentrações mais elevadas, quando comparadas ao tratamento controle. Conclui-se que o uso de biorreatores de imersão temporária constitui uma estratégia altamente eficiente para a propagação de *C. nobilior*, e que a biomassa de *Chlorella* sp. pode ser direcionada à multiplicação, conservação *ex situ* e controle do desenvolvimento das plantas.

Palavras-chave: Bioestimulante; Microalga; Espécie nativa.

Chlorella sp. ON *VITRO* CULTIVATION OF *Cattleya nobilior* Rchb.f.

ABSTRACT

The micropropagation of orchids represents an essential strategy for *ex situ* conservation and the commercial production of threatened native species, such as *Cattleya nobilior* Rchb.f., native to the Brazilian Cerrado and Amazon Forest. The search for sustainable and low-cost alternatives to optimize *in vitro* cultivation protocols has driven the use of organic supplements and biostimulants, among which microalgae stand out. In this context, the present study aimed to evaluate the effect of adding dry biomass of *Chlorella* sp., at different concentrations, combined with distinct *in vitro* culture systems, on the growth of *C. nobilior*. Plants obtained from asymbiotic germination were cultivated in half-strength MS medium supplemented with 0.0, 0.15, 0.30, 0.45 and 0.60 g L^{-1} of *Chlorella* sp. biomass, using a conventional culture system (SCC) and a temporary immersion bioreactor (BIT). After 90 days of cultivation, the following variables were evaluated: number of leaves, number of roots, number of shoots, fresh mass, length of the longest leaf, longest root, shoot length, and total plant length. A completely randomized design was adopted in a 2 × 5 factorial scheme (two micropropagation systems and five concentrations of *Chlorella* sp.), with four replicates. The results revealed a significant interaction between culture systems and microalga concentrations for most of the variables analyzed, with superior performance of the BIT compared to the SCC. Supplementation with *Chlorella* sp. biomass resulted in higher values for shoot production, number of leaves, and shoot length; however, at higher concentrations, it restricted vegetative growth when compared to the control treatment. It is concluded that the use of temporary immersion bioreactors constitutes a highly efficient strategy for the propagation of *C. nobilior*, and that *Chlorella* sp. biomass can be directed toward multiplication, *ex situ* conservation, and the control of plant development.

Keywords: Biostimulant; Microalga; Native species.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae, com mais de 30.000 espécies descritas, é reconhecida como a maior entre as angiospermas e se destaca pela elevada diversidade morfológica e por sua relevância ecológica e econômica (WFO, 2026). Entre os gêneros de maior importância econômica no Brasil, *Cattleya* sp. se destaca devido à exuberância floral, elevado potencial de hibridação e alta demanda comercial (PANT et al., 2020).

A espécie *Cattleya nobilior* Rchb.f., descrita por Henrique Gustavo Reichenbach em 1883, ocorre em matas secas e apresenta adaptações associadas a ambientes com luminosidade, sendo encontradas predominante no Cerrado brasileiro (Cerrado *stricto sensu*) (BIANCHETTI, 2007). Suas flores variam de tons rosa escuro a lilás, conferindo à espécie alto valor ornamental e grande representatividade sociocultural na região Centro-Oeste (NUNES et al., 2025; FLORA E FUNGA, 2026) (FIGURA 1).

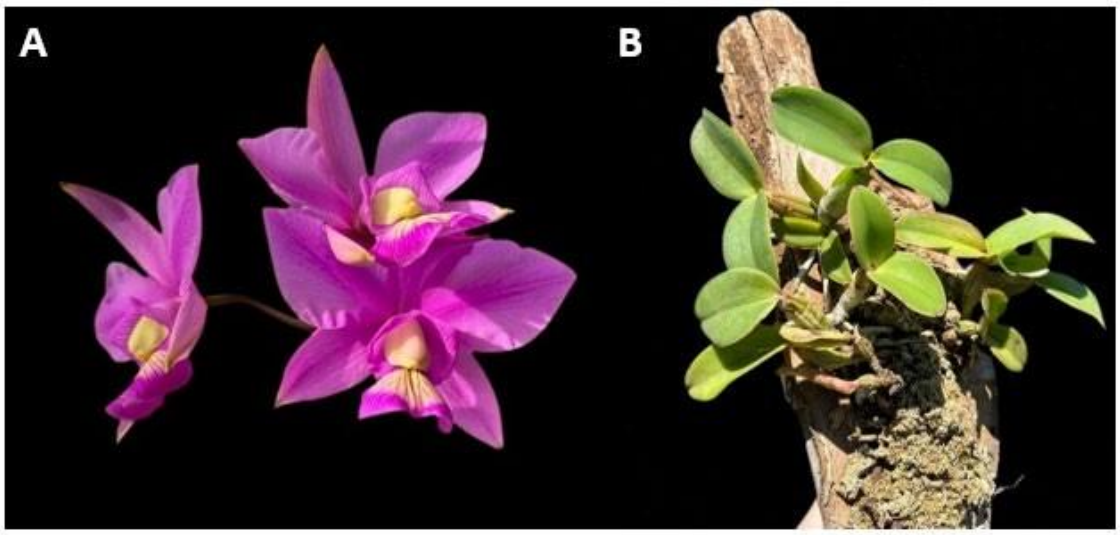


FIGURA 1. Aspectos morfológicos gerais de *Cattleya nobilior* Rchb.f. A- Flor e B- Aspectos gerais. Foto: Peinado, R. B., 2026.

Apesar dessa relevância, as orquídeas estão entre os grupos mais vulneráveis às pressões antrópicas. A fragmentação de habitats, a coleta predatória e a expansão agrícola colocam em risco a dinâmica populacional e a variabilidade genética dessas espécies (LIANG et al., 2024). Além disso, os métodos convencionais de propagação não conseguem produzir um número adequado de orquídeas que atenda às demandas para fins comerciais e de conservação (NONGDAM et al., 2023; VENDRAME et al., 2023).

Nesse contexto, o cultivo *in vitro* tem se mostrado uma alternativa tecnicamente eficiente tanto para conservação *ex situ* quanto para a produção comercial (BELLO-BELLO et al., 2025; KUMAR et al., 2022). Essa estratégia é fundamental para espécies que apresentam sementes com viabilidade reduzida ou que não podem ser armazenadas de forma convencional, as quais necessitam de rápida propagação e estabelecimento massal para evitar a perda do germoplasma. Diante disso, estratégias que modulam o desenvolvimento, como o crescimento lento (*slow growth*), tornam-se ferramentas valiosas para conservar a genética vegetal por longos períodos com menor manutenção (CHAUHAN et al., 2019; PETROVA et al., 2021).

Para produção em escala, os biorreatores de imersão temporária (BIT) têm se destacado como tecnologia promissora otimizando a qualidade e a eficiência do processo (NONGDAM et al., 2023; VENDRAME et al., 2023; CAPACI et al., 2024; BELLO-BELLO et al., 2025). Para *C. nobilior*, há evidências de que a micropropagação pode ser otimizada com o uso de biorreatores e meios enriquecidos (NUNES et al., 2025). O uso de suplementos orgânicos vem sendo explorado como estratégia para reduzir custos e favorecer o desenvolvimento, uma vez que diferentes compostos podem atuar sobre a divisão e diferenciação celular (DE STEFANO et al., 2022; HAMDENI et al., 2022).

Dessa forma, as microalgas vêm ganhando destaque na formulação de bioinsumos. A biomassa de *Chlorella* sp. apresenta elevado teor de proteínas e moléculas bioativas (MIRANDA et al., 2024). Estudos indicam a presença de fitormônios endógenos nessa microalga, como auxinas e citocininas, que são fundamentais para estimular a divisão celular e o alongamento dos tecidos vegetais, além de giberelinas e ácido abscísico (LU et al., 2015; COLARTE et al., 2025). Além disso, a presença de polissacarídeos e pigmentos antioxidantes, como carotenoides, desempenha papel importante na proteção contra estresses e na regulação metabólica (TONIOLO et al., 2023; SUN et al., 2022; PRISA et al., 2023; PARMAR et al., 2023; COLARTE et al., 2025).

Tais características justificam a utilização da *Chlorella* sp. em protocolos *in vitro*, atendendo às diretrizes da Política Nacional de Bioinsumos (BRASIL, 2020) e aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU (ODS 2, 12 e 15), por fomentar tecnologias mais sustentáveis e eficientes (ONU, 2015).

Ainda não foram reportados trabalhos na literatura científica avaliando a resposta de *C. nobilior* à suplementação com biomassa de *Chlorella* sp. associada ao sistema BIT. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da adição da biomassa

de *Chlorella* sp. no meio de cultivo e em diferentes sistemas de cultivo *in vitro* sobre o crescimento de *C. nobilior*, contribuindo para o aprimoramento de protocolos sustentáveis de propagação comercial e conservação *ex situ* dessa espécie nativa do Cerrado.

Como hipótese, assume-se que a adição de *Chlorella* sp. influencia o desenvolvimento morfofisiológico das plantas, podendo atuar tanto no estímulo ao vigor quanto na modulação do crescimento para fins de conservação (*slow growth*), dependendo da interação com o sistema de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultivo *in vitro* de Flores e Plantas Ornamentais (LCFPO) da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) (22°11'53.2" S; 54°56'02.3" W), Dourados – MS, Brasil.

Para o estudo, foram utilizadas plantas de *Cattleya nobilior* Rchb.f., obtidas a partir de germinação assimbiótica de cultivo *in vitro*. As sementes de *C. nobilior* foram provenientes de frutos maduros de plantas matrizes cultivadas em Orquidário da Faculdade de Ciências Agrárias da UFGD, coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50%, propiciando irradiância de 235 μmol $m^{-2}s^{-1}$, sob condições médias de temperatura e umidade relativa de 22,6± 5 ºC e 73,9 ± 10%, respectivamente, com irrigação realizada por microaspersores tipo bailarina, posicionados a um metro acima das plantas, totalizando uma lâmina de água de 1 mm dia^{-1}.

Os frutos maduros foram colhidos e alocados no dissecador de vidro com sílica-gel durante um período de 14 dias e em seguida armazenadas no banco de germoplasma do LCFPO sob refrigeração de 5 ± 1 ºC. Posteriormente, as sementes foram submetidas ao teste de tetrazólio, seguindo a metodologia proposta por Ribeiro et al. (2021). Após a confirmação da viabilidade, amostras de 0,005 g de sementes de foram levadas para ambiente asséptico e desinfestadas com 15 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%, por 5 minutos. Em seguida, receberam tríplice lavagem com água destilada. Logo após, o volume da suspensão foi completado para 50mL com água destilada estéril para a realização da semeadura *in vitro* (SOARES et al., 2020).

Na etapa de germinação, utilizou-se o meio MS de Murashige e Skoog (1962), na metade da concentração de sais (MS 1⁄2). O pH do meio foi aferido e ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave, realizada a 121°C por 20 minutos. A semeadura foi realizada com o auxílio de um pipetador automático inoculando-se 1,0 mL da suspensão de sementes por frasco, e em seguida o material foi acondicionado em sala de crescimento com temperatura, irradiância e fotoperíodo controlados (25±2 °C; 18,9 μmol $m^{-2}s^{-1}$; 16 h, respectivamente) permanecendo nessas condições por 120 dias.

Cultivo *in vitro*

Decorridos 120 dias, para o início do experimento, foram utilizadas plantas com aproximadamente 1,0 ± 0,5 cm de comprimento, transferidas em ambiente asséptico para meio MS (½), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose com diferentes concentrações de biomassa seca *Chlorella* sp.: 0,0; 0,15; 0,30; 0,45; ou 0,60 g L^{-1} (Figura 2). As concentrações da *Chlorella* foram adaptadas de acordo com Corbellini et al. (2020). Em seguida, as plantas foram alocadas em dois sistemas de micropropagação: 1) Sistema de Cultivo Convencional (SCC); 2) Biorreator de Imersão Temporária (BIT). A biomassa seca de *Chlorella* sp. foi adquirida comercialmente em casa de armazém natural.



FIGURA 2. Meios de cultivo MS (½) suplementados com biomassa seca de *Chlorella* sp. nas concentrações de 0,15; 0,30; 0,45 e 0,60 g L^{-1} utilizadas no cultivo *in vitro* de *Cattleya nobilior*. Dourados – MS, UFGD, 2026. Foto: Peinado, R. B., 2026.

No SCC, foram utilizados frascos contendo 75 mL de meio de cultura, solidificado com 7,0 g L^{-1} de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia), sendo inoculadas seis plantas por frasco, os frascos foram tampados com filme de cloreto de polivinila (PVC) perfurado e coberto com filtro de algodão. No BIT, foram utilizados 750 mL dos mesmos meios, sem agente geleificante, com o equipamento programado em ciclos de imersão de 5 minutos a cada 6 horas, sendo inoculadas 60 plantas por biorreator. Em ambos os sistemas, adotou-se a proporção de 12,5 mL de meio por planta, visando padronizar a disponibilidade de meio entre os tratamentos.

Para todos os tratamentos o pH foi aferido e ajustado para 5,8 utilizando hidróxido de potássio (KOH) (0,1M) ou ácido clorídrico (HCl) (1%) antes da esterilização em autoclave (121 °C e 1,1 atm de pressão), por 20 minutos. As culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com fotoperíodo, temperatura e irradiância

controladas (16 horas; 25±2 °C; 18,9 μmol $m^{-2}s^{-1}$). Permanecendo nessas condições por 90 dias.

Ao final de 90 dias, as plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente até total remoção do meio de cultivo e avaliadas quanto ao número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de brotações (NB), comprimento da maior folha (CMF) (mm), comprimento da maior raiz (CMR) (mm), comprimento da parte aérea (CPA) (mm), comprimento total (CT) (CT = CPA+ CMR) (mm), e massa fresca (MF) (g). Os tratamentos foram fotografados com câmera acoplada em mini estúdio fotográfico.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 × 5 (dois sistemas de micropropagação: SCC e BIT; e cinco concentrações de *Chlorella* sp.), com quatro repetições, sendo a unidade experimental o frasco em ambos os sistemas. No SCC, cada frasco continha seis plantas, no BIT, cada frasco continha 60 plantas. As variáveis foram mensuradas em todas as plantas de cada frasco, e os dados foram consolidados como média por frasco para fins de análise estatística.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e, quando constatada significância pelo teste F ($p \leq 0,05$), as médias referentes ao sistema de cultivo foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para as concentrações de *Chlorella* sp., realizou-se análise de regressão, testando os modelos linear e quadrático ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo da interação entre as concentrações de biomassa seca de *Chlorella* sp. (0,0; 0,15; 0,30; 0,45; e 0,60 g L^{-1}) e os sistemas de cultivo (convencional e BIT) nas características comprimento da parte aérea (CPA, mm), comprimento total (CT, mm), comprimento da maior folha (CMF, mm), comprimento da maior raiz (CMR, mm) e massa fresca (MF, g). A análise de variância também evidenciou efeito significativo isolado dos sistemas de cultivo nas características número de folhas (NF), número de raízes (NR). A concentração apresentou efeito significativo isolado sobre as variáveis de número de folhas (NF), número de raízes (NR) e número de brotos (NB) (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo da análise de variância do comprimento da parte aérea (CPA), comprimento total (CT, mm), comprimento da maior folha (CMF, mm), comprimento da maior raiz (CMR, mm), massa fresca (MF, g), número de folhas (NF), número de raízes (NR), e número de brotos (NB) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos (convencional e BIT) e diferentes concentrações de biomassa seca de *Chlorella* sp. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

F. V	GL	.....Pr > Fc.....			
		CPA	CT	CMF	CMR
Sistemas	1	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Concentração	4	0,0007*	0,0000*	0,0075*	0,0000*
Sistemas x Concentração	4	0,0265*	0,0001*	0,0281*	0,0000*
Total		947,77	8493,52	627,19	7008,91
Média Geral		6,32	21,54	5,26	15,22
C.V. (%)		12,08	11,28	11,35	14,06
F. V	GL	.....Pr > Fc.....			
		MF	NF	NR	NB
Sistemas	1	0,0000*	0,0000*	0,0053*	0,1136ns
Concentração	4	0,0000*	0,0058*	0,0000*	0,0040*
Sistemas x Concentração	4	0,0002*	0,2554ns	0,2560ns	0,8822ns
Total		0,62	959,85	591,49	279,73
Média Geral		0,092	5,77	5,55	0,63

C.V. (%)	1,65	13,48	11,31	28,47

F. V: fator de variação; C.V (%): coeficiente de variação; Pr > Fc probabilidade maior que F calculado; GL: grau de liberdade; *, ns: significativo e não significativo.

Para o comprimento da parte aérea (CPA), foi observado efeito significativo entre os fatores sistema de cultivo e concentrações. No sistema de cultivo BIT o maior valor encontrado (8,4 mm) foi na concentração de 0,49 g L^{-1} de *Chlorella* sp, já no sistema convencional a concentração de 0,60 g L^{-1} apresentou 5,77 mm de comprimento da parte aérea (FIGURA 3).

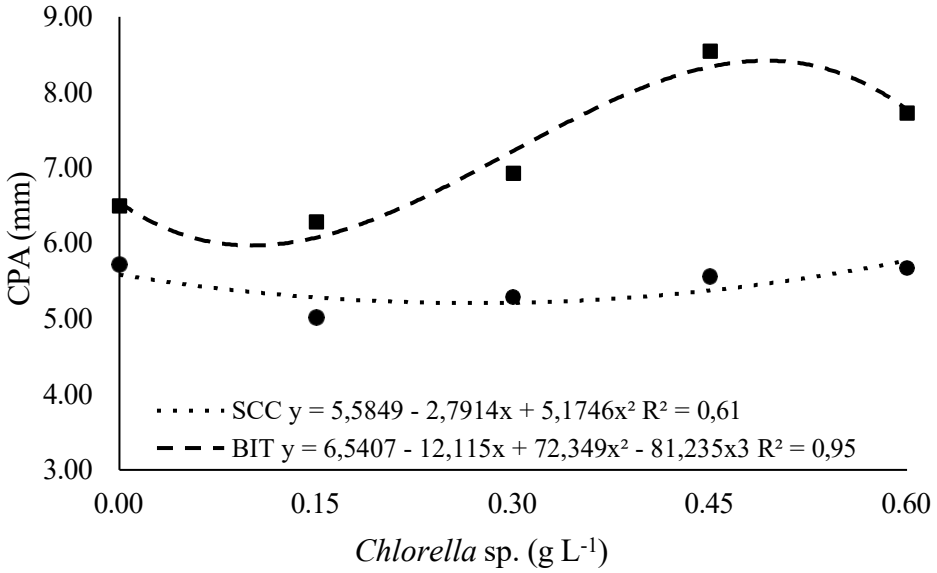


FIGURA 3. Comprimento da parte aérea (CPA) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos e concentrações de biomassa seca de *Chlorella* sp. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

Para o comprimento total (CT), os meios de cultivo sem *Chlorella* sp. apresentaram os maiores valores em ambos os sistemas de cultivo, para o BIT (28,10 mm) e no sistema convencional (23,41 mm) (FIGURA 4).

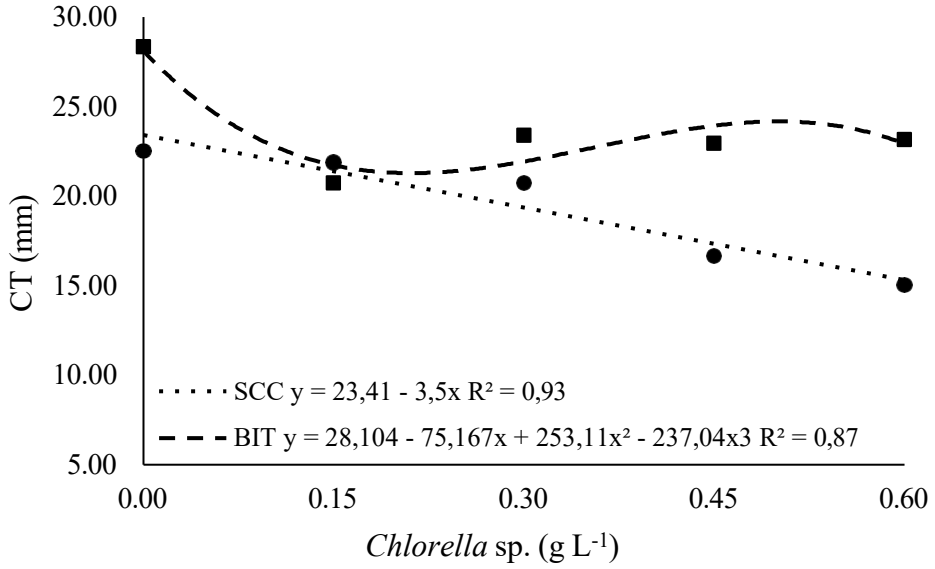


FIGURA 4. Comprimento total (CT) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos e concentrações de biomassa seca de *Chlorella* sp. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

Para o comprimento da maior folha (CMF), o sistema de cultivo BIT apresentou 6,74 mm de comprimento, utilizando a concentração de 0,49 g L^{-1} e o sistema convencional apresentou 5,05 mm de comprimento sem a utilização de *Chlorella* sp. (FIGURA 5).

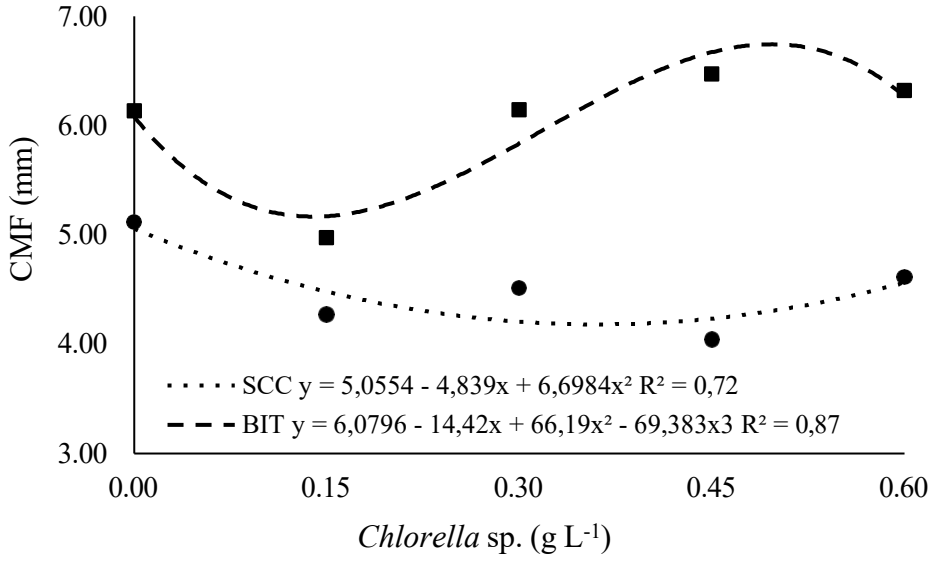


FIGURA 5. Comprimento da maior folha (CMF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos e concentrações de biomassa seca de *Chlorella* sp. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

No comprimento da maior raiz (CMR), em ambos os de sistemas de cultivo o tratamento controle apresentou os maiores comprimentos de raiz, sendo observadas raízes de 21,56 e 17,14 mm no BIT e SCC, respectivamente (FIGURA 6).

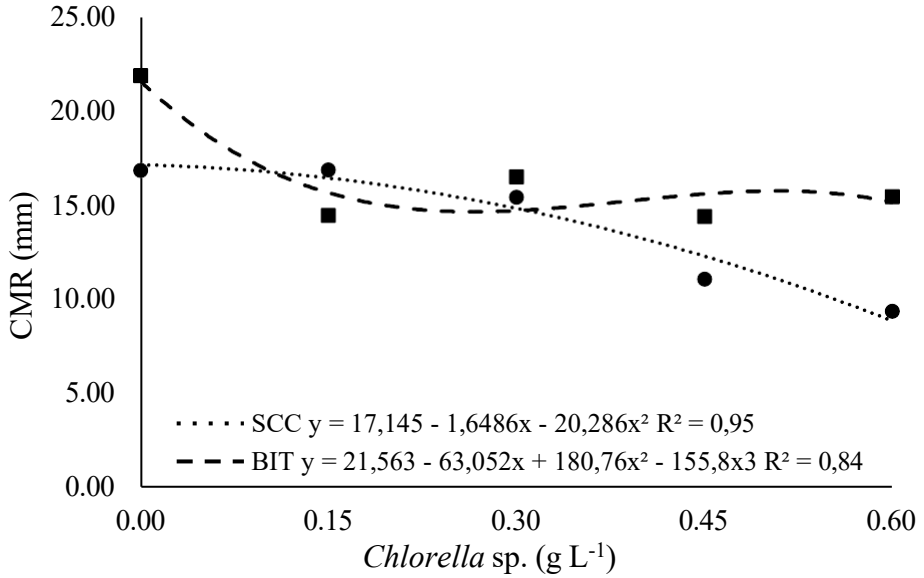


FIGURA 6. Comprimento da maior raiz (CMR) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos e concentrações de biomassa seca de *Chlorella* sp. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

Quanto a massa fresca, o tratamento controle de *Chlorella* sp. apresentaram os maiores valores observados sendo 0,167g para o BIT e 0,0971g para o sistema convencional (FIGURA 7).

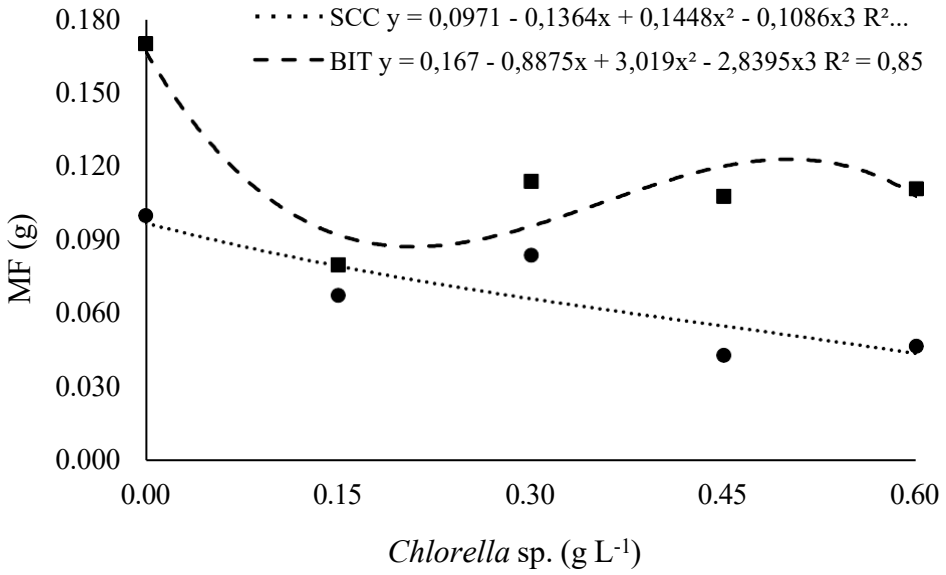


FIGURA 7. Massa fresca (MF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos e concentrações de biomassa seca de *Chlorella* sp. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

Tanto o número de folhas (NF) quanto o número de raízes (NR), apresentaram efeito significativo isolado para ambos os fatores estudados. Para o fator concentração o maior número de folhas foi observado na concentração 0,60 g L^{-1} de *Chlorella* sp. com 6,20 folhas (FIGURA 8), para o número de raízes, o tratamento controle tiveram os maiores valores observados sendo 6,21 raízes (FIGURA 9).

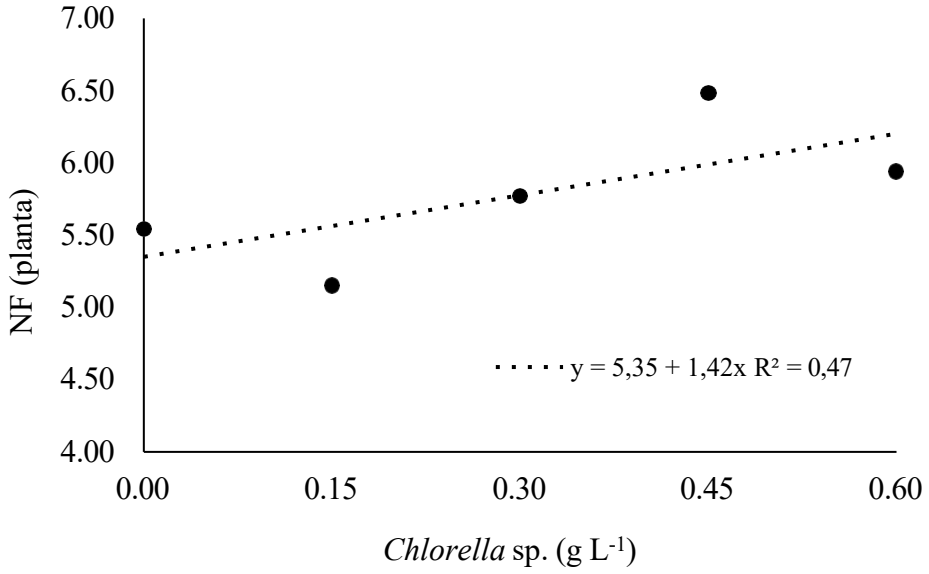


FIGURA 8. Número de folhas (NF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função das concentrações de biomassa seca de *Chlorella* sp. de após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

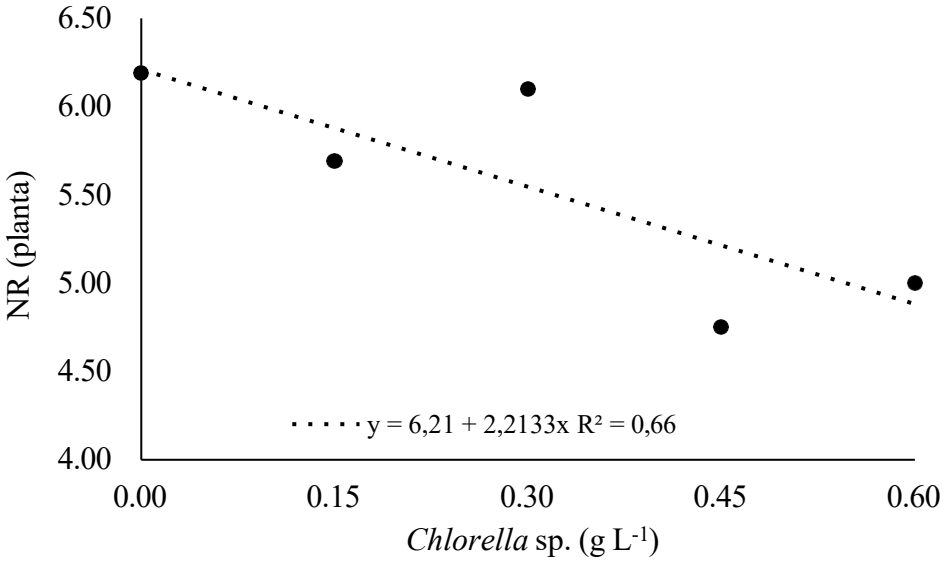


FIGURA 9. Número de raízes (NR) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função das concentrações de biomassa seca de *Chlorella* sp. de após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

Para o número de folhas (NF) e número de raízes (NR), também foi observado efeito significativa isolado para o fator sistemas de cultivo, para ambas as variáveis o sistema BIT apresentou os maiores valores observados, sendo 6,67 folhas para NF e 5,81 raízes para NR (QUADRO 2).

QUADRO 2. Número de folhas (NF) e número de raízes (NR) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes sistemas de cultivos (convencional e BIT) após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

Sistemas	NF	NR
CONV	4,88b	5,28b
BIT	6,67a	5,81a
Média geral	5,77	5,55
C.V. (%)	13,48	11,31

C.V (%): coeficiente de variação; médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Para o número de brotos (NB), foi verificado efeito significativo isolado para o fator concentração. Na concentração de 0,51g L^{-1} de *Chlorella* sp. apresentou o maior observado de 0,95 brotos/planta (FIGURA 10).

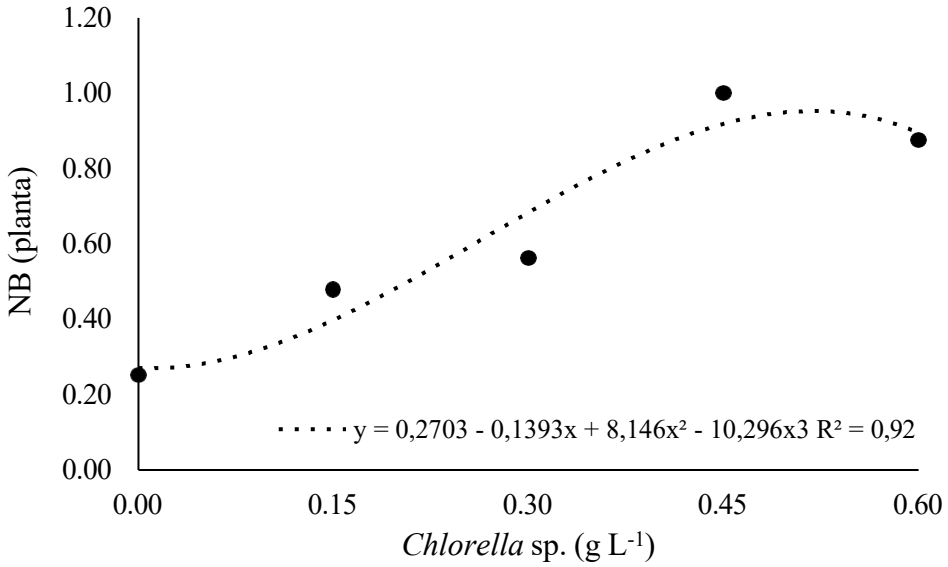


FIGURA 10. Número de brotos (NB) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função das diferentes concentrações de biomassa seca de *Chlorella* sp. após 90 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2026.

Os resultados obtidos evidenciam a superioridade do biorreator de imersão temporária (BIT) em relação ao sistema convencional (SCC) para a maioria das variáveis de crescimento de *C. nobilior*, como observado na Figura 11. Isso pode ter ocorrido pelo

fato de que, no BIT, o contato intermitente do meio líquido com os explantes promove a renovação da atmosfera interna do frasco, garantindo maior disponibilidade de oxigênio para a respiração celular e facilitando a difusão de nutrientes diretamente para os tecidos (NONGDAM et al., 2023). Esse dinamismo reduz a espessura da camada limite gasosa sobre as folhas, o que otimiza as trocas gasosas e minimiza desordens fisiológicas comuns no cultivo estático, como a hiperidricidade e a asfixia radicular (ONTANEDA et al., 2020; VENDRAME et al., 2023).

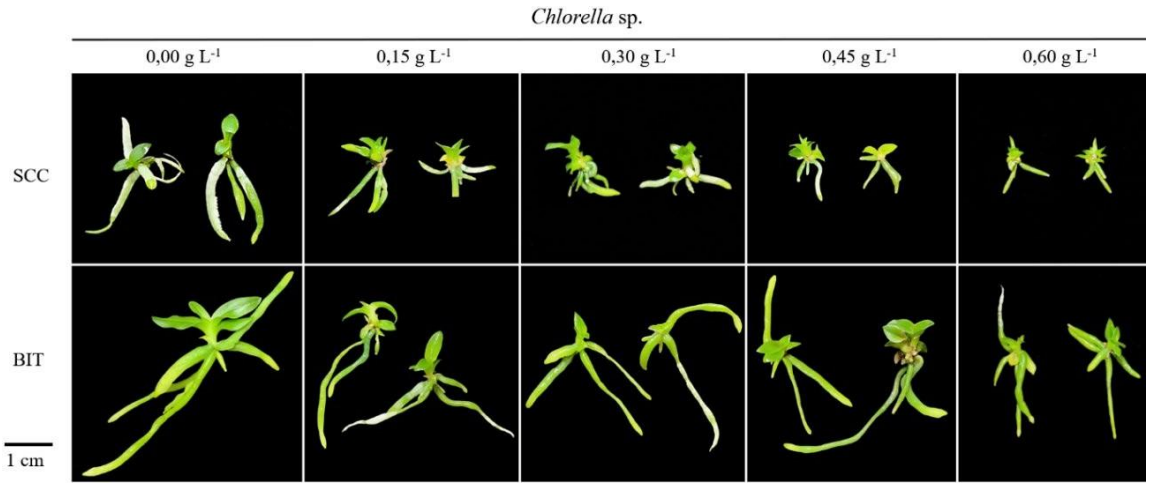


FIGURA 11. Plantas de *Cattleya nobilior* Rchb.f. em função de diferentes sistemas de cultivos e diferentes concentrações de extrato de biomassa seca de *Chlorella* sp. após 90 dias de cultivo *in vitro*. SCC = sistema de cultivo convencional; BIT = biorreator de imersão temporária. Dourados – MS, UFGD, 2026.

A eficiência do BIT observada neste trabalho, com incrementos significativos no número de folhas e raízes, corrobora uma ampla gama de estudos recentes. Ganhos similares em biomassa e vigor foram reportados para *Brassavola nodosa* (L.) Lindl. (VENDRAME et al., 2023), *Vanda celebica* Rolfe (LAILY et al., 2024), *Cattleya tigrina* A.Rich. (FRITSCHE et al., 2022) e *Mokara* leuenberger (MINH, 2022). Em todos esses casos, a imersão temporária favoreceu o desenvolvimento morfológico superior em comparação ao meio semissólido. Além disso, trabalhos recentes com híbridos como *Rhyncattleanthe* Queen Bee (SOLANO-RODRÍGUEZ et al., 2025) e com a própria

Cattleya nobilior Rchb.f. (NUNES et al., 2025) reforçam a aplicabilidade e a robustez desse sistema para a micropropagação em larga escala de diferentes gêneros de orquídeas.

Em relação à suplementação com biomassa de *Chlorella* sp., os dados revelaram uma interação complexa. Enquanto o tratamento controle (sem microalga) proporcionou os maiores valores para comprimento total (CT), comprimento de raiz (CMR) e massa fresca (MF), a adição da microalga em concentrações específicas estimulou a formação de novas estruturas (folhas e brotos), porém com menor tamanho individual. Esse comportamento de redução do alongamento em resposta a extratos de algas já foi documentado na literatura. Magalhães (2021), ao trabalhar com *Cattleya elongata* Barb.Rodr., observou efeito inibitório sobre o crescimento linear quando utilizou extrato de *Ascophyllum nodosum*, sugerindo que altas concentrações de compostos bioativos podem exercer efeito fitotóxico ou supressor sobre a expansão celular.

Similarmente, Amatuzzi (2020) relatou que o extrato da macroalga *Ulva fasciata* inibiu o desenvolvimento de orquídeas à medida que aumentou a concentração. Em contrapartida, em outro estudo, Amatuzzi (2018) verificou que baixas doses de *Kappaphycus alvarezii* estimularam o número de brotos e folhas em *Epidendrum secundum* Jacq. Esses resultados contraditórios na literatura reforçam que a resposta vegetal a bioestimulantes compostos por algas é dose-dependente e espécie-específica. No caso de *C. nobilior*, a *Chlorella* sp. parece ter atuado, nas concentrações testadas, mais como um regulador de crescimento do tipo citocinínico — que quebra a dominância apical e estimula brotação lateral (aumento de NB e NF) — do que como um promotor de alongamento (auxínico), resultando em plantas mais compactas e ramificadas.

Além da ação hormonal, a redução de crescimento e biomassa (MF, CT) observada nos tratamentos com *Chlorella* sp. pode estar associada a alterações no potencial osmótico do meio ou ao acúmulo de compostos fenólicos e sais minerais presentes na biomassa da alga, gerando um estresse abiótico controlado. Carmo et al. (2020) observaram fenômeno semelhante em *Comanthera mucugensis* (Giul.) L.R.Parra & Giul. tratada com algas vermelhas, onde o estresse induzido pelo extrato reduziu o crescimento, mas desencadeou mecanismos de sobrevivência, como a emissão de brotações adventícias.

Tais resultados evidenciam uma importante aplicabilidade biotecnológica de *Chlorella* sp. para a conservação de germoplasma vegetal. A limitação do crescimento

vegetativo, associada à indução de brotações, constitui uma condição favorável para o estabelecimento de protocolos de crescimento lento (*slow growth*), que podem ser utilizados para a conservação de espécies nativas, principalmente aquelas que apresentam reduzida viabilidade das sementes produzidas.

Ainda, em bancos de germoplasma, prioriza-se a manutenção da estabilidade fisiológica das plantas pelo maior tempo possível sem a necessidade de subcultivos frequentes (CHAUHAN et al., 2019). O perfil observado nas plantas tratadas com *Chlorella* sp., caracterizado por porte reduzido e sistema radicular contido, mas com meristemas ativos, alinha-se a esses protocolos conservacionistas. Resultados semelhantes têm sido reportados em estudos de conservação *in vitro* de orquídeas, tais como *Catasetum integerrimum* Hook (LÓPEZ-PUC et al., 2022) e *Cattleya tigrina* A. Rich. (SÁ et al., 2022), *Cattleya schilleriana* Rchb.f. (ANDRADE et al., 2025), nos quais a redução do crescimento vegetativo, sem comprometimento da viabilidade, é utilizada como estratégia eficaz para a manutenção de germoplasma *ex situ* por períodos prolongados.

Dessa forma, o estudo aponta para duas rotas tecnológicas distintas: para a produção comercial em larga escala, o sistema BIT sem suplementação mostrou-se mais eficiente. Por outro lado, para a manutenção de coleções de germoplasma, a suplementação com *Chlorella* sp. apresenta-se como uma alternativa promissora, induzindo um estado de crescimento lento benéfico para a conservação da espécie a médio prazo.

CONCLUSÃO

O sistema de Biorreator de Imersão Temporária mostra-se superior ao convencional para a micropropagação de *Cattleya nobilior* Rchb.f., promovendo maior crescimento e enraizamento. A suplementação com *Chlorella* sp. atua como modulador de crescimento, sendo que sua ausência favorece a produção de mudas para fins comerciais, enquanto concentrações *Chlorella* sp. induzem redução de porte e maior brotação, sendo recomendadas para protocolos de conservação de germoplasma, tais como o *slow growth*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, G. V. S.; NADAL, M. C.; PASQUAL, M.; REIS, M. V.; DÓRIA, J. Adaptive response to conservation of Cattleya schilleriana Rchb. f. under slow growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 162, n. 2, p. 29, 2025.

AMATUZZI, J. C. A. **Efeito de extratos de algas marinhas na morfogênese *in vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq**. 2018. 52 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) — Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

AMATUZZI, J. C. DE A., VIEIRA, L. DO N., SANT'ANNA-SANTOS, B. F., NOSEDA, M. D., FRAGA, H. P. DE F. Improved *in vitro* development of *Epidendrum secundum (Orchidaceae)* by using aqueous extract of the seaweed *Kappaphycus alvarezii (Rhodophyta, Solieriaceae)*. *Acta Physiologiae.* **Plantarum**, 42 (136), 1-9, 2020.

BELLO-BELLO, J. J.; MANCILLA-ÁLVAREZ, E.; SPINOSO-CASTILLO, J. L. Scaling-up procedures and factors for mass micropropagation using temporary immersion systems. ***In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant**, p. 1-12, 2025.

BIANCHETTI, L.B. *Cattleya nobilior* Rchb. f. **Heringeriana**, v. 1, p. 9-10, 2007.

BRASIL. Estado de Mato Grosso do Sul. **Lei Ordinária nº 5.316, de 4 de janeiro de 2019.** Designa a orquídea Cattleya nobilior como flor símbolo do Estado de Mato Grosso do Sul e dá outras providências. Diário Oficial do Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, n. 9.814, p. 1, 7 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 61, de 8 de julho de 2020. Estabelece as regras sobre definições, exigências, especificações, garantias, tolerâncias, registro, embalagem e rotulagem dos fertilizantes orgânicos e dos biofertilizantes, destinados à agricultura. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 134, p. 5, 15 jul. 2020.

CAPACI, P.; BAROZZI, F.; FORCINITI, S.; ANGLANA, C.; IUELE, H.; ACCOGLI, R. A.; CARRA, A.; LENUCCI, M. S.; DEL MERCATO, L. L.; DI SANSEBASTIANO, G. P. RITA® temporary immersion system (TIS) for biomass growth improvement and *ex situ* conservation of *Viola ucriana*. *Plants*, v. 13, n. 24, p. 3530, 2024.

CARMO, L. P.; MOURA, C. W. N.; LIMA-BRITO, A. Red macroalgae extracts affect *in vitro* growth and bud formation in *Comanthera mucugensis*. **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 29–34, 2020.

CHAUHAN, R.; SHARMA, V.; DEVI, R.; SHARMA, P. *In vitro* conservation of plant genetic resources: a review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 3, p. 1406–1412, 2019.

COLARTE, C. A.; BALIC, I.; DÍAZ, Ó.; CORTES, I.; MORENO, A. A.; AMENABAR, M. J.; CASTRO RETAMAL, M.; CARO FUENTES, N. Microalgae-Based Biostimulants: Effects on Growth and Stress Resistance in Agricultural Crops. **Plants**, v. 14, n. 22, p. 3488, 2025.

CORBELLINI, J. R.; RIBAS, L. L. F.; MAIA, F. R. de; CORRÊA, D. D. O.; NOSEDA, M. D.; SUZUKI, R. M.; AMANO, É. Effect of microalgae *Messastrum gracile* and *Chlorella vulgaris* on the *in vitro* propagation of orchid *Cattleya labiata*. Journal of Applied Phycology, Dordrecht, v. 32, n. 6, p. 4013-4027, 2020.

DE STEFANO, D.; COSTA, B. N. S.; DOWNING, J.; FALLAHI, E.; KHODDAMZADEH, A. *In-vitro* micropropagation and acclimatization of an endangered native orchid using organic supplements. **American Journal of Plant Sciences**, v. 13, n. 3, p. 380-393, 2022.

Flora e Funga do Brasil. *Orchidaceae in* **Flora e Funga do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB179>. Acesso em: 06 jan. 2026.

FRITSCHE, Y.; PINHEIRO, M. V. M.; GUERRA, M. P. Light quality and natural ventilation have different effects on protocorm development and plantlet growth stages of the *in vitro* propagation of *Epidendrum fulgens*. **South African Journal of Botany**, v. 146, p. 864-874, 2022.

HAMDENI, I.; LOUHAICHI, M.; SLIM, S.; BOULILA, A.; BETTAIEB, T. Incorporation of organic growth additives to enhance *in vitro* tissue culture for producing genetically stable plants. **Plants**, v. 11, n. 22, p. 3087, 2022.

KUMAR, A.; CHAUHAN, S.; RATTAN, S.; WARGHAT, A. R.; KUMAR, D.; BHARGAVA, B. *In vitro* propagation and phyto-chemical assessment of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: an orchid of pharma-horticultural importance. **South African Journal of Botany**, v. 144, p. 261-269, 2022.

LAILY, A. N.; MAHARIJAYA, A.; WULANDARI, D. R.; PUSPITANINGTYAS, D. M.; ARIATI, S. R.; MARTIN, A. F.; HAPSARI, B. W. Optimizing micropropagation of *Vanda celebica* using organic compounds and a temporary immersion system. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 52, n. 4, p. 14065, 2024.

LIANG, C.; LI, J.; LI, S.; ZHANG, H.; ZHENG, J.; MIAO, J.; HAO, S.; WU, S.; LIU, Z.; ZHAI, J. Human activity changed the genetic pattern of the orchid *Phaius flavus* population. **Diversity,** v. 16, n. 11, p. 685, 2024.

LÓPEZ PUC, G.; HERRERA-COOL, G. J. Asymbiotic germination, *in vitro* conservation and regeneration of *Catasetum integerrimum*. **Polibotánica**, n. 53, p. 135–149, 2022.

LU, Yandu; XU, Jian. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology?. **Trends in plant science**, v. 20, n. 5, p. 273-282, 2015.

MAGALHÃES, Daniela Gomes. **Extrato da macroalga parda *Ascophyllum nodosum* no cultivo e conservação in vitro de plantas ornamentais da Chapada Diamantina-BA**. 2021. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) — Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, 2021.

MINH, T. V. Micropropagação da orquídea Mokara pela técnica de sistema de imersão temporária. **International Journal of Research and Innovation in Applied Science**, v. 7, n. 5, p. 54–58, 2022.

MIRANDA, A. M.; HERNANDEZ-TENORIO, F.; VILLALTA, F.; VARGAS, G. J.; SÁEZ, A. A. Advances in the development of biofertilizers and biostimulants from microalgae. **Biology,** v. 13, n. 3, p. 199, 2024.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.
NONGDAM, P.; BELESKI, D. G.; TIKENDRA, L.; DEY, A.; VARTE, V.; EL MERZOUGUI, S.; PEREIRA, V. M.; BARROS, P. R.; VENDRAME, W. A. Orchid micropropagation using conventional semi-solid and temporary immersion systems: a review. **Plants**, v. 12, n. 1136, 2023.

NUNES, G. P.; SORGATO, J. C.; RAMOS, J. C. M.; SOARES, J. S.; REZENDE, R. K. S.; PEINADO, R. B. Innovations in micropropagation of the orchid *Cattleya nobilior*: the effect of bioreactor and enriched culture media. **Ciência Rural**, v. 55, n. 6, e20240271, 2025.

ONTANEDA, A. L. C.; HERRERA, A. M.; BATISTA, R. M. G. Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional *in vitro*. **Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas**, v. 3, n. 2, p. 173–182, 2020.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). Transformando nosso mundo: a Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável. Nova York: ONU, 2015. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs> . Acesso em: 16 jan. 2026.

PADMAJA, V. V.; PAVANI, K.; SRILATHA, P.; LALITHA, K.; SARADA, G.; NAIK, M. R.; KIRAN, Y. D.; GOPAL, K. Role of biostimulants in horticulture: a review. **International Journal of Environment and Climate Change,** v. 13, n. 8, p. 1146–1157, 2023.

PANT, M.; NEGI, A.; SINGH, A.; GAUTAM, A.; RAWAT, M. *Cattleya* orchids: a mini review. **Journal of Critical Reviews,** v. 7, n. 12, p. 2394–2512, 2020.

PARMAR, P.; KUMAR, R.; NEHA, Y.; SRIVATSAN, V. Microalgae as next generation plant growth additives: functions, applications, challenges and circular bioeconomy-based solutions. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1073546, 2023.

PETROVA, M.; ZAYOVA, E.; GENEVA, M.; DIMITROVA, L.; VITKOVA, A.; STANILOVA, M. Multiplication and conservation of threatened medicinal plant *Arnica montana* L. by *in vitro* techniques. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 86, n. 1, p. 57-65, 2021.

PRISA, D.; SPAGNUOLO, D. Plant production with microalgal biostimulants. **Horticulturae**, v. 9, n. 7, p. 829, 2023.

RIBEIRO, L. M.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; RAMOS, J. C. M. Methodology of the tetrazolium test for identifying viable seeds of orchids of the genus *Cattleya* native to the Brazilian Cerrado. *Semina:* **Ciências Agrárias**, v. 42, p. 1351–1360, 2021.

SÁ, T. S. A. M.; COSTA, A. S. da; BLANK, M. D. F. A.; BLANK, A. F.; MOURA, G. M. S.; SOARES, C. A. Propagação e conservação *in vitro* de *Cattleya tigrina*. **Ciência Rural**, v. 52, e20200517, 2022.

SOARES, J. S.; SORGATO, J. C.; RIBEIRO, L. M. Protocol for asymbiotic germination and initial protocorm development of Brazilian Cerrado native orchids. **Rodriguésia,** v. 71, e01332018, 2020.

SOLANO-RODRÍGUEZ, L. A.; GALINDO-TOVAR, M. E.; CASTAÑEDA-CASTRO, O.; HIDALGO-CONTRERAS, J. V.; MURGUÍA-GONZÁLEZ, J.; CUATRA-XICALHUA, G. L.; VIÁN-PÉREZ, J. G.; MENDOZA DEL ÁNGEL, M.; PASTELÍN-SOLANO, M. C. *In Vitro* Cultivation of the Orchid Hybrid *Rhyncattleanthe Queen* Bee JLA 1 and Its Propagation Under Different Systems. **Horticulturae**, v. 11, n. 7, p. 722, 2025.

SUN, T.; RAO, S.; ZHOU, X.; LI, L. Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. **Molecular Horticulture**, v. 2, n. 1, p. 3, 2022.

TONIOLO, C., NICOLETTI, M. Quality control of microalgae-derived products. Chapter 43. Hand Book of Food and Feed from Microalgae, Production, Application, Regulation, and Sustainability. **Available online**, v. 23, p. 567-575, 2023.

VENDRAME, A. W.; XU, J.; BELESKI, D. G. Micropropagation of *Brassavola nodosa* (L.) Lindl. Using SETISTM bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 153, n. 1, p. 67-76, 2023.

WFO - WORLD FLORA ONLINE. Orchidaceae Juss. Disponível em: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-7000000429 >. Acesso em: 06 jan. 2026.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho demonstrou que o uso de bioinsumos associado a sistemas modernos de cultivo *in vitro* representa uma estratégia eficiente para a otimização da propagação de *Cattleya nobilior* Rchb.f.

No primeiro capítulo, o extrato aquoso foliar de *Moringa oleifera* Lam. comprovou seu potencial como bioestimulante, promovendo incrementos significativos no crescimento vegetativo e no enraizamento das plantas, apresentando-se como uma alternativa viável aos reguladores de crescimento sintéticos para a propagação *in vitro* de plantas dessa espécie.

No segundo capítulo, a biomassa de *Chlorella* sp., associada ao sistema de Biorreator de Imersão Temporária (BIT), revelou ambiguidade biotecnológica. Enquanto o sistema BIT sem *Chlorella* sp. maximizou a eficiência produtiva, a adição dessa microalga permitiu a modulação do crescimento vegetal, induzindo características ideais para a conservação *in vitro* de germoplasma.

De forma integrada, os resultados obtidos contribuem para o avanço da floricultura sustentável, oferecendo protocolos distintos e complementares: um voltado para a aceleração da produção comercial, utilizando *M. oleifera* ou BIT sem adição de *Chlorella* sp. e outro utilizado para a conservação de germoplasma, utilizando *Chlorella* sp. Essas inovações fortalecem a cadeia produtiva de espécies nativas do Cerrado, alinhando eficiência técnica com os princípios da bioeconomia e da sustentabilidade.